



UNIVERSITÀ DI PISA

DIPARTIMENTO DI FARMACIA
Corso di Laurea Magistrale in Farmacia

TESI DO LAUREA

***VALIDAZIONE DI MARCATORI NELLA DIAGNOSI
DI TUMORI SALIVARI MALIGNI***

RELATORI:

Prof. Antopnio Lucacchini

Prof Gino Giannaccini

CORRELATORE:

Dott.ssa Laura Giusti

CANDIDATA:

Ilaria Camerini

ANNO ACCADEMICO 2014/2015

*Ai miei genitori Marcella e Angelo
e a mio fratello Jacopo.*

INDICE

RIASSUNTO	6
INTRODUZIONE	7
Anatomia: la Parotide.....	7
Fisiologia	8
Epidemiologia e fattori di rischio.....	9
Classificazione Istologica	12
Tumori benigni	15
Adenoma pleomorfo (AP).....	15
Tumore di Warthin	16
Tumori maligni (MT).....	16
Carcinoma mucoepidermoide	16
Carcinoma adenoido-cistico	17
Adenocarcinoma a cellule acinose	18
Carcinoma a cellule aciniche.....	18
Chirurgia e Trattamento	21
Proteomica	23
Cenni storici.....	23
Analisi dei marcatori	24
SCOPO DELLA TESI.....	32
MATERIALI E METODI.....	33
Pazienti e raccolta dei campioni.....	33
Preparazione dei campioni	33
Precipitazione delle proteine in acido tricloroacetico	33
Dosaggio proteico RC/DC Biorad	34
Western Blot	35
Analisi Blot (statistica).....	37
RISULTATI E DISCUSSIONE.....	38

Anxa1	39
CapzA1 e CapzB.....	42
Cofilina (CFL 1)	47
CONCLUSIONI.....	51
BIBLIOGRAFIA.....	53

RIASSUNTO

In questi anni abbiamo visto incrementare l'interesse scientifico nella ricerca di biomarcatori diagnostici e prognostici che diano una risposta precisa mediante l'introduzione di nuove tecniche di analisi. L'analisi proteomica è la nuova metodica su cui la comunità scientifica sta cercando di far luce, per riuscire a determinare una patologia partendo dal genoma, arrivando al proteoma. Questa tecnica mira all'obiettivo di identificare i modelli di espressione proteica di un determinato processo fisiopatologico per giungere ad una diagnosi corretta. Questo studio ha cercato di delineare un profilo proteomico dei tumori delle ghiandole salivari maggiori (*Major Salivary Gland Tumors*- MSGT) cercando di aumentare l'accuratezza diagnostica che tutt'oggi dipende in massima parte dal campione prelevato con ago aspirato, modalità molto sensibile e legata all'esperienza del centro anatomopatologico in cui viene condotta e analizzata.

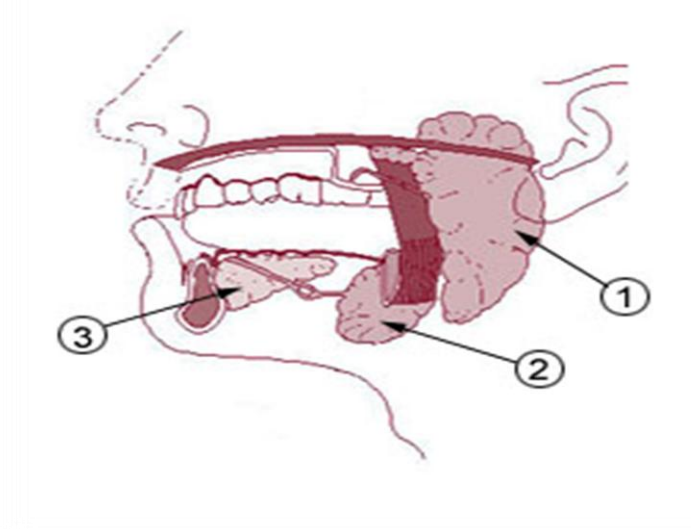
Per raggiungere tali obiettivi, in questo studio, sono stati analizzati i campioni prelevati con ago aspirato di 44 pazienti di cui 17 con adenoma pleomorfo e 27 con carcinoma mucoepidermoide. Dopo aver precipitato le proteine e creato dei pool proteici è stata eseguita l'analisi con elettroforesi bidimensionale con successiva analisi con lo spettrometro di massa per riconoscere la diversa espressione di alcune proteine tra i due istotipi neoplastici. Sono state trovate 4 proteine altamente specifiche, 3 per il tumore maligno e 1 per il tumore benigno. Successivamente abbiamo inserito le informazioni in un software per avere informazioni più precise di queste proteine per comprendere meglio il ruolo patogenetico che rivestono nella oncogenesi di questi tumori. Questo lavoro dimostra che l'analisi proteomica rappresenta la nuova frontiera per la classificazione di neoplasie, di qualsiasi istotipo e che oltre ai tumori delle ghiandole salivari maggiori si possa estendere in futuro anche al riconoscimento di altre neoplasie.

INTRODUZIONE

Anatomia: la Parotide

La ghiandola parotide è un organo pari, di colore giallastro, del peso di 25-30 g. È la più voluminosa delle ghiandole salivari maggiori che si dividono in: *ghiandole parotide, sottomandibolare e sottomandibolare* (Fig. 1) (Anatomia del Grey Inc.) [1]. Ciascuna ghiandola è contenuta in una speciale loggia, detta *loggia parotidea*, che si trova dietro al ramo della mandibola, nello spazio

Figura 1. Ghiandole salivari maggiori
#1 Ghiandola parotide; #2 Ghiandola sottomandibolare; #3 Ghiandola sottomandibolare



compreso tra questo e il margine anteriore del processo mastoideo, al di sotto del condotto uditivo esterno, lateralmente alla faringe. Accolta nella loggia omonima è rivestita dalla capsula parotidea. La capsula si presenta come una lamina fibrosa strettamente aderente alla superficie ghiandolare, ha

origine dalla fascia cervicale superficiale, dalla quale dipartono dei tralci tissutali che, approfondendosi nella ghiandola, la segmentano. Dalla fascia prende origine anche il setto interghiandolare che separa la parotide dalla ghiandola sottomandibolare [2].

La parotide presenta un corpo di forma prismatico-triangolare e contiene prevalentemente cellule sierose. Esse, sono dette ghiandole sierose e producono una saliva liquida contenente ptialina, ma priva di mucina [3].

All'interno delle parotidi decorrono l'arteria carotide esterna, la vena faciale posteriore, il nervo faciale, il nervo auricolo-temporale e i vasi linfatici.

Il suo dotto escretore è chiamato *dotto parotideo* (o *di Stenone*) e nasce dalla confluenza di due dotti secondari; esso emerge dal margine anteriore della ghiandola e, seguendo il prolungamento anteriore, si porta in avanti sulla faccia laterale del muscolo massetere, poi si dirige medialmente attraverso il muscolo buccinatore, decorre per un breve tratto al di sotto della mucosa della guancia e si apre nel vestibolo della bocca a livello del colletto del secondo molare superiore [4].

Fisiologia

La saliva è prodotta dalle ghiandole esocrine dette appunto salivari. La saliva costituisce il succo digestivo della bocca. Essa ha importanti funzioni: *digestiva* (amido cotto), per il suo contenuto in amilasi (ptialina); *solvente* ed *emolliente*, per il suo contenuto in acqua e mucina; *protettiva* della mucosa orale e dei denti, per il suo contenuto in acqua e ioni. La mancanza di saliva per lungo tempo non influisce tanto sulla digestione dell'amido cotto che è assicurata dalla potente amilasi pancreatica, quanto sull'integrità e funzionalità dei tessuti orali. Nella *xerostomia* (da salivazione deficiente), infatti, la mucosa orale è infiammata e le corone dentarie sono corrose. Perciò il contributo più importante della saliva è assicurare la protezione dei denti e della mucosa orale [5]. Le ghiandole sottomascellari contribuiscono, per il 70% al volume giornaliero di saliva secreta, mentre le parotidi e le sottomandibolari per il 20 e 5 %, rispettivamente. La composizione della saliva varia notevolmente a seconda del tipo di ghiandola e della modalità o intensità di stimolazione [5]. I costituenti sono di due categorie: inorganici (acqua e ioni vari) ed organici (proteine). I principali *cationi* contenuti nella saliva sono Na^+ e K^+ , mentre gli *anioni* sono Cl^- , HCO_3^- e PO_4^{3-} . Il pH della

saliva, che allo sbocco dei dotti varia tra 5,8 (parotide) e 6,4 (sottomascellare), è molto sensibile alla velocità del flusso salivare: se questo aumenta, aumenta anche il pH, indipendentemente dallo stimolo applicato. Ciò sembra sia conseguenza dell'aumentata produzione di HCO_3^- che la stimolazione causa. Le proteine della saliva possono distinguersi in due tipi: proteine del siero e proteine intrinseche. Le prime sono costituite da tracce di albumina e d'immunoglobulina (IgA). Le seconde comprendono, invece, l'enzima α -amilasi (ptialina), il lisozima e varie glicoproteine (mucina) [5].

Epidemiologia e fattori di rischio

Le neoplasie delle ghiandole salivari maggiori (Major Salivary Gland Tumors-MSGT) sono patologie rare e rappresentano nel complesso circa il 10% dei tumori cervico-cefalici e l'1% delle neoplasie totali dell'uomo. In Italia, l'incidenza per gli istotipi benigni è di 7,2 casi/100.000 abitanti/anno, mentre quella delle forme maligne è molto più bassa e si attesta attorno a 0,7/100.000 abitanti/anno. La mortalità delle neoplasie maligne è stimabile intorno ai 0,2 casi/100.000 abitanti/anno, mentre la sopravvivenza a 5 anni dalla diagnosi è del 50-60%; la sopravvivenza è maggiore nelle regioni del Centro-Nord rispetto a quelle del Mezzogiorno, probabilmente a causa di un ritardo della diagnosi nelle regioni meridionali [6]. I dati italiani sono sovrapponibili alle altre popolazioni europee e del resto del mondo, come dimostrato da uno studio condotto nella provincia di Valparaíso, Cile. Questo studio vuole determinare la prevalenza dei tumori delle ghiandole salivari diagnosticati tra il 2000 e il 2011. Furono raccolti 297 campioni di tumore delle ghiandole salivari maggiori. I tassi di incidenza per 100.000/abitante erano 15,4 per l'adenoma pleomorfo e 2,51 per il carcinoma mucoepidermoide. La maggior parte delle neoplasie corrisponde a tumori benigni (70,3 %). La ghiandola più colpita, tra le ghiandole salivari maggiori, è stata la ghiandola parotide. Tra i tumori benigni il più frequentemente riscontrato era

l'adenoma pleomorfo (53,8 %) mentre il carcinoma mucoepidermoide era il tumore maligno più riscontrato (7,2%) [7]. La parotide costituisce in generale la sede di gran lunga più colpita (80%), mentre sottomandibolari e salivari accessorie lo sono in minima misura (circa 10%) [8]. Del tutto insolite le localizzazioni sottolinguali [9].

Relativamente all'età media di comparsa di un tumore salivare, questa risulta molto più precoce nelle forme benigne nella fascia intorno ai 40 anni, rispetto a quelle maligne, che a loro volta presentano un picco di incidenza intorno all'ottava decade di vita [10]. La quasi totalità (95%) dei tumori maligni delle ghiandole salivari è infine riscontrabile esclusivamente nell'adulto [11]. Considerando globalmente tutte le primitive salivari, benigne o maligne, esiste una prevalenza nella donna rispetto all'uomo, anche se la distribuzione per sesso varia a seconda dell'istotipo. Nello specifico, tra i tumori maligni la predilezione per sesso femminile determina un rapporto di 3:2 per il carcinoma mucoepidermoide, il carcinoma adenoidocistico ed il carcinoma a cellule aciniche è di 2:1 per l'adenocarcinoma polimorfo a basso grado e il carcinoma epimioepiteliale [10].

L'eziologia delle neoplasie salivari è poco conosciuta e, a differenza della maggior parte di tutte le neoplasie cervico-facciali, non è esplicitamente associabile all'abuso di tabacco e alcool e, concretamente, non dispone di fattori di rischio provvisti di specificità d'organo [12]. Come risulta dalla letteratura internazionale, a tutt'oggi le radiazioni ionizzanti sono l'unico fattore di rischio ufficialmente riconosciuto, in grado di interagire soprattutto attraverso trattamenti radioterapici, radiazioni di origine occupazionale, radiazioni ultraviolette, incidenti nucleari ed esplosioni atomiche [13]. Il rischio di sviluppare nuove neoplasie radio indotte è tanto più elevato quanto più giovane è l'età in cui i pazienti sono stati trattati. Le ghiandole salivari si sono dimostrate radiosensibili nei confronti della carcinogenesi, con una decisa preferenza per la

localizzazione parotidea [14]. Le neoplasie salivari benigne possono a loro volta rappresentare un fattore di rischio intermedio e, infatti, si ricorda la potenziale capacità di trasformazione maligna dell'adenoma pleomorfo. Nel 1968 Berg segnalò una possibile associazione tra cancro delle ghiandole salivari e cancro della mammella, dal momento che pazienti affette da neoplasia salivare presentavano un incremento del rischio di produrre una neoplasia mammaria di almeno otto volte maggiore [15]. Altri studi riportano poi un'incidenza statisticamente significativa di sviluppare una neoplasia salivare, dopo neoplasia mammaria, ma con un incremento del rischio solo due volte superiore [16]. Tale associazione può non essere determinante, ma fornisce dati per ritenere che le neoplasie salivari siano probabilmente assimilabili a tumori ormono-dipendenti [17]. Un certo numero di virus è stato chiamato in causa nella patogenesi dei tumori delle ghiandole salivari. È ben noto il coinvolgimento del virus di **Epstein- Barr** o **Human herpes virus 4** (HHV-4) nella genesi di alcuni carcinomi linfoepiteliali [18].

I possibili effetti cancerogeni dovuti ai campi di radiofrequenza elettromagnetica emessi dai telefoni cellulari hanno costituito in questi ultimi anni, visto l'attuale utilizzo del prodotto, notevole motivo d'interesse e sono divenuti sempre più oggetto di studio. Le ricerche epidemiologiche apparse fino ad oggi hanno concentrato l'attenzione sulla possibile associazione tra telefonia mobile e rischio di tumori cerebrali, tenendo conto dell'elevata esposizione ai campi elettromagnetici che comporta la stretta vicinanza esistente tra antenna del telefono mobile e lobo temporale. Un altro bersaglio è senza dubbio la ghiandola parotide, che risulta soprattutto esposta all'assorbimento delle microonde generate da cellulari e cordless. Tali radiazioni vengono assorbite dai tessuti biologici, dando luogo ad un loro riscaldamento, cosa che può indurre effetti di varia natura e costituire quindi un fattore di rischio. [19]. Alcuni studi sperimentali hanno dimostrato che l'esposizione cronica alla nicotina può portare a modificazione morfo-funzionali a carico delle ghiandole salivari e nonostante

alcuni Autori [20] abbiano osservato nei forti fumatori una potenziale associazione tra abitudine al fumo e neoplasie salivari, di fatto il tabacco non viene ritenuto un reale fattore di rischio [21]. Una relazione simile, statisticamente non significativa, sembra esistere tra consumo di alcool e neoplasie salivari. Nel 1990 Spitz [22] avrebbe tuttavia osservato nella donna un rischio apparentemente più elevato nei confronti di questa patologia, mediato aumento della biodisponibilità di etanolo, peculiare della donna.

Classificazione Istologica

L'istologia dei MSGT (*Major Salivary Gland Tumors*-**MSGT**) è molto complessa ed estremamente eterogenea, proprio per questo nel tempo si sono susseguite numerose classificazioni. Al momento, la classificazione di riferimento è quella elaborata dalla Organizzazione Mondiale della Sanità (**OMS**) nel 2005 che suddivide le lesioni delle ghiandole salivari in: lesioni simil-tumorali, tumori benigni e tumori maligni.

CLASSIFICAZIONE OMS 2005

Lesioni simil-tumorali

- Scialoadenosi
- Oncocitosi
- Scialometaplasia necrotizzante
- Cisti salivari
- Scialoadenite cronica sclerosante (tumore di Kuttner)
- Lesione linfoepiteliale benigna (scialo adenite mioepiteliale)
- Iperplasia linfoide cistica in AIDS

Tumori benigni

- Adenoma pleomorfo
- Mioepiteliale
- Adenoma a cellule basali
- Adenoma canalicolare
- Cistoadenoma (benigno)
 - Cistoadenoma capillifero
 - Cistoadenoma mucinoso
- Tumore di Warthin
- Oncocitoma
- Papilloma duttale
 - Papilloma duttale invertito
 - Papilloma intraduttale
 - Scialoadenoma papillifero
- Adenoma sebaceo
- Linfoadenoma

Tumori maligni

Carcinomi

- Carcinoma a cellule aciniche
- Carcinoma muco epidermoide
- Carcinoma adenoide-cistico
- Carcinoma polimorfo a basso grado di malignità

- Carcinoma epiteliale-mioepiteliale
- Carcinoma a cellule chiare non altrimenti specificato (**N.A.S.**)
- Carcinoma a cellule basali
- Cistoadenocarcinoma
- Cistoadenocarcinoma cribriforme di basso grado
- Adenocarcinoma mucinoso
- Carcinoma dei dotti salivari
- Oncocitoma maligno
- Adenocarcinoma **N.A.S.**
- Carcinoma in adenoma pleomorfo
- Carcinosarcoma
- Carcinoma sebaceo
- Lipoadenocarcinoma sebaceo
- Carcinoma squamocellulare
- Carcinoma a piccole cellule
- Carcinoma a grandi cellule
- Carcinoma linfocitoma

Neoplasie non epiteliali

- Linfomi
- Emangioma
- Neoplasie secondarie
- Neoplasie non classificabili

Tumori benigni

I tessuti salivari possono essere sede di numerose lesioni benigne di vario tipo. I tumori benigni delle ghiandole salivari sono presenti con un'incidenza del 7,2 per 100.000 abitanti. L'istotipo più frequente è l'adenoma pleomorfo per il 71% seguito dal tumore di Warthin per il 22%.

Adenoma pleomorfo (AP)

Rappresenta il 60% delle neoplasie delle ghiandole salivari. Nell'80% dei casi è interessata la ghiandola parotidea, nel 10% la sottomandibolare, e nel 10% le salivari minori. Il sesso femminile è più frequentemente coinvolto, tra la terza e la quarta decade di vita. Istologicamente è un tumore misto costituito da una parte epiteliale e da una mesenchimale egualmente rappresentate. Nel 90% dei tumori si trovano delle aree in cui i tumori crescono in una rete di fasci formati da tralci di cellule fusate che non sempre sono collegate fra loro, ma a volte sono completamente isolate [23]. In circa un terzo dei casi predomina questo schema lasso-mixoide [23]. Il tumore insorge prevalentemente a livello del lobo superficiale della parotide in corrispondenza del polo inferiore. Molto spesso, accanto alla lesione centrale, si riscontrano alcuni noduli satellite uniti alla lesione centrale con ponti [24].

Si spiega così la multifocalità del tumore con un numero frequente di recidive nei pazienti sottoposti a terapia chirurgica parziale. Talvolta le cellule neoplastiche infiltrano e superano la capsula per pseudopodia. Tale comportamento rende ragione della multifocalità del tumore e delle tendenze alla recidiva. Dallo 0,8% al 6,8% le recidive presenti possono comparire anche dopo un periodo variabile con un range dai 4 ai 12 anni. Dall'1% al 6% dei casi, si può avere una trasformazione maligna verso il carcinoma adenoide cistico. Il trattamento deve essere chirurgico mediante parotidectomia parziale [24].

Tumore di Warthin

È il secondo tumore più frequente della ghiandola parotidea di cui ne è la sede elettiva e quasi esclusivamente nei maschi (95%) [23, 24]. Di solito è localizzato nel bordo inferiore, presso l'angolo della mandibola [25]. Si manifesta prevalentemente nei maschi con età media di 62 anni, raramente si riscontra prima. [24]. Si presenta come una tumefazione non dolente, sferica, liscia, di grandezza fluttuante. [25]. Si forma dalle strutture epiteliali dei linfonodi intraparotidei ed è pertanto costituito da una componente epiteliale e da una linfoide. Macroscopicamente viene evidenziato come un nodulo a lenta crescita, ben capsulato (e per tanto facilmente enucleabile); per la sua componente cistica si presenta soffice alla palpazione. È spesso bilaterale, multifocale e, a differenza dell'adenoma pleomorfo, non ha alcuna potenzialità evolutiva maligna.

Tumori maligni (MT)

I tumori maligni delle ghiandole salivari sono rari, presenti con un'incidenza dello 0,7% per 100.000 abitanti; rappresentano poco meno dell'1% dei tumori della testa e del collo. Interessano soggetti anziani nella settima decade di vita prevalentemente di sesso maschile. Di seguito verranno elencati i principali istotipi maligni primitivi riscontrati nel nostro studio.

Carcinoma mucoepidermoide

È il tumore maligno più frequente tra le ghiandole salivari maggiori. Rappresenta il 5% di tutti i tumori della testa e del collo e il 30% dei tumori maligni delle ghiandole salivari. Nel 50-60% dei casi ha origine nelle ghiandole salivari maggiori e nell'80% nella parotide [24]. Questo tipo di tumore si presenta con maggior frequenza in età adulta tra la quarta e la quinta decade di vita, ma può essere riscontrato anche in età pediatrica, costituendone l'istotipo più frequente in

questa fascia di età. Questi tumori hanno origine dalle cellule dei dotti e come illustra il nome sono costituiti da cellule epidermoidi e cellule contenenti muco [23]. Il nome è ben lontano dal descriverli interamente poiché vi è una terza cellula chiamata “cellula intermedia”, più piccola di entrambe le altre due, che assomiglia molto a certe cellule del dotto della ghiandola salivare [23]. Ne deriva la formazione di tumori a prevalente componente solida, caratterizzata da un alto grado di malignità, o mucipara che si manifesta con aspetto cistico. Obiettivamente si presenta come una formazione nodulare asintomatica a lento accrescimento. Le varianti ad alta differenziazione possono però infiltrare i tessuti, provocando dolore e dare metastasi linfonodali, polmonari e ossee. Esiste una prevalenza nel sesso femminile [24].

Carcinoma adenoido-cistico

Ha un'incidenza del 2% per la parotide. Colpisce prevalentemente la femmina di età compresa tra i 40 e i 60 anni. Prende origine dalle cellule dei dotti intercalari e terminali, la caratteristica di queste cellule è che hanno la capacità di differenziarsi sia in senso epiteliale che in quello mioepiteliale. Metastasi a distanza per via ematica sono presenti dal 20% al 60% dei casi a localizzazione polmonare, epatica, cerebrale e ossea, quest'ultima espressione di un'elevata aggressività clinica. Si presenta come una tumefazione solida, poco mobile per l'infiltrazione dei tessuti circostanti, che evoca precocemente una spiccata sintomatologia dolorosa per infiltrazione dei rami nervosi, con i secondari danni funzionali che ne derivano [24]. Viene riportato un caso insolito di presentazione coesistente di carcinoma adenoido-cistico (ACC) con calcoli salivari nella ghiandola parotidea che non è mai stata riportata in letteratura. La coesistenza di calcoli duttali riconducibili all'ACC è rara. L'insorgenza del calcolo parotideo potrebbe essere dovuta alla lunga ostruzione dei dotti causata dall'ACC della

parotide a crescita lenta oppure alla possibilità che il tumore maligno si sviluppi a causa di irritazione cronica da calcoli parotidei [26].

Adenocarcinoma a cellule acinose

Questi tumori istologicamente distinti dai precedenti sono a basso grado di malignità e piuttosto rari [23]. Sembra che originino dalle cellule acinose del tessuto salivare e che si limitino alla ghiandola parotidea. Nella solita disposizione microscopica circondata da cellule poligonali con un nucleo scuro ed eccentrico, ed un citoplasma basofilo finemente granulare, sono addossati strettamente l'uno all'altro a volte in gruppi rugosi ed acinosi [23]. Anche se sono a basso grado di malignità, queste lesioni metastatizzano sia regionalmente che in sedi lontane [23].

Carcinoma a cellule aciniche

Rappresenta il 2-4% dei tutti i tumori salivari e il 10% di quelli maligni. Colpisce per l'80% la parotide; non esiste una rilevante predominanza tra il sesso maschile e quello femminile. Si riscontra prevalentemente nei soggetti di età compresa tra i 40 e i 50 anni, tuttavia si deve ricordare che è il secondo tumore maligno delle ghiandole salivari subito dopo il mucoepidermoide, che compare in età pediatrica. Clinicamente è caratterizzato da una manifestazione dolorosa e nel 3-8% dei casi si può presentare all'esordio come una paralisi facciale [24].

Clinica

L'anamnesi riguarda la raccolta di sintomi specifici d'organo e generali. Sintomi specifici d'organo solo le alterazioni quantitative della saliva quali un aumento o una diminuzione, qualitative quali un incremento della viscosità e temporali in relazione alla masticazione. Bisogna indagare sul dolore e sul suo andamento che può essere transitorio, duraturo e diffuso o, irradiato. Sintomi generali riguardano la coesistenza di diabete, malattie autoimmuni, terapie mediche o radianti in atto o pregresse come precedenti interventi chirurgici sul cavo orale o sul collo. L'ispezione esterna serve a rilevare eventuali segni di interessamento del nervo facciale, di asimmetrie di lato e l'ispezione endorale deve rilevare variazioni di trofismo della mucosa e dei denti. La palpazione comparativa dovrà essere esterna ed endorale delle ghiandole per evidenziare volume, forma, dolorabilità, mobilità e consistenza [24].

La rilevazione di un tumore delle ghiandole salivari (in particolare della parotide) è generalmente casuale e consegue alla palpazione. Difatti i MSGT benigni sono spesso asintomatici e quindi riscontrati accidentalmente sotto forma di noduli o cisti a livello dell'angolo mandibolare (nel caso della parotide), del collo (per la sottomandibolare) o del pavimento orale (per la ghiandola sottolinguale). La comparsa di dolore o un tasso di crescita particolarmente rapido sono invece sintomi di sospetto per una neoplasia maligna [6].

Patologie traumatiche, infiammatorie o tumorali della ghiandola parotide possono dar luogo alla paralisi del facciale. La paralisi del facciale, quando è totale, determina flaccidità dei muscoli facciali e stiramento della rima labiale, mancata chiusura della palpebra, impossibilità di elevare il sopracciglio e scomparsa del corrugamento della fronte. Nella paralisi parziale, ovvero in caso di lesioni che colpiscono il nervo facciale dopo la sua suddivisione, potrà verificarsi la paralisi nel territorio inferiore del volto, importante soprattutto dal

lato estetico oppure nel territorio superiore, importante per le lesioni corneali, che la mancanza dell'ammiccamento e della protezione palpebrale comportano [27].

Tra le diverse metodiche di imaging impiegate per lo studio delle ghiandole salivari, l'ecografia rappresenta, per la sua non invasività, nonché per il basso costo, la metodica di più frequente impiego e di più rapida e facile esecuzione [27]. Essa consente la dettagliata valutazione morfologica delle ghiandole salivari maggiori ed è diventata un'indagine elettiva, complementare all'esame clinico, nello studio sia della patologia infiammatoria che delle forme espansive. Presenta lo svantaggio di non consentire lo studio della ghiandola nel suo insieme, perché non è in grado di visualizzare le porzioni ghiandolari al di sotto dell'osso mandibolare. Tuttavia, nell'iter diagnostico, l'ecografia trova largo impiego nel guidare l'aspirazione e il drenaggio di raccolta ascessuali, nonché nella guida di procedure di ago-aspirazione o agobiopsia per esami cito-istologici per la diagnosi di natura [27]. Nell'iter diagnostico delle neoplasie della parotide e delle ghiandole sottomandibolari, la citologia con ago sottile eseguita sotto ecografia, rappresenta un esame di primo livello, di rapida esecuzione, accurato e gravato da una bassa percentuale di complicazioni [27]. L'accuratezza diagnostica della citologia con ago sottile è stata ormai dimostrata dalle numerose esperienze presenti in letteratura, che riportano una sensibilità dell'85-99% e una specificità del 96-100%. Questo esame rappresenta pertanto, uno strumento efficace nella pianificazione della strategia terapeutica ed è in grado di modificare l'approccio clinico al trattamento dei tumori salivari in circa un terzo dei casi. Oltre l'ecografia, gli esami radiologici più frequenti impiegati nella valutazione delle neoplasie delle ghiandole salivari sono TC (tomografia computerizzata) e la RM (risonanza magnetica). Tuttavia, nella maggior parte dei casi, in assenza di chiari segni di infiltrazione loco-regionali, questi esami non sono in grado di fornire una diagnosi certa di natura e pertanto, l'impiego routinario in prima istanza, di queste ultime metodiche è ritenuto poco efficace e costoso [27].

Le indicazioni alla Tomografia Assiale Computerizzata (TAC) e/o alla Risonanza Magnetica Nucleare (RMN) comprendono tutti i casi di neoplasie salivari maligne o recidive, i casi di neoplasie di grandi dimensioni e/o localmente avanzate in cui si sospetti un coinvolgimento di strutture che pregiudichino l'operabilità (spazio parafaringeo, arteria carotide, ecc.). L'impiego della TAC è più appropriato nel sospetto di infiltrazioni del tessuto osseo, mentre la RMN è particolarmente indicata nei casi in cui si deve porre diagnosi differenziali tra tessuto infiammatorio e tessuto neoplastico. Ulteriori indicazioni elettive delle RMN sono inoltre rappresentate dai tumori delle ghiandole salivari minori, del lobo profondo della parotide e di quelli dello spazio parafaringeo [28].

Chirurgia e Trattamento

Il trattamento dei tumori salivari maligni è complesso a causa della loro incidenza, dell'imprevedibile e variabile aggressività biologica e del loro prolungato rischio di recidiva. L'intervento chirurgico rappresenta il fulcro terapeutico di questa patologia. L'approccio al tumore primitivo è rappresentato dalla resezione con intento curativo. Per quanto riguarda le neoplasie benigne della parotide, il trattamento chirurgico di scelta è rappresentato dalla parotidectomia superficiale nel caso di neoplasie localizzate a tale livello. Nel caso di tumori maligni, è indicata la parotidectomia totale conservativa del nervo facciale, ove possibile. Il sacrificio del nervo facciale viene eseguito in caso di infiltrazione massiva del nervo con assenza di un piano di clivaggio dalla neoplasia. Se la neoplasia ha invaso i tessuti extraparotidei, la chirurgia va allargata con eventuale mandibulectomia o resezione parziale dell'osso mascellare o temporale [29]. È importante tenere presente che un interessamento linfonodale laterocervicale è presente in media nel 15% dei casi, aumentando nei tumori ad alto grado (49%) e nelle masse che superano i 4 cm (20%) [29]. Terapie complementari e alternative per la gestione dei tumori maligni delle ghiandole salivari, nella gran parte dei pazienti, prevede l'asportazione chirurgica

del tumore primitivo seguita da radioterapia. Uno studio ha cercato di caratterizzare meglio il paziente, il tumore, e caratteristiche di sopravvivenza a lungo termine di adenocarcinoma a cellule basali (BCAC) delle ghiandole salivari maggiori con il database (1998-2012) del National Cancer (NCDB) [30]. Tra i principali tumori delle ghiandole salivari nel NCDB, sono stati trovati 509 casi di BCAC (1,4%), 88% dei quali erano nelle ghiandole parotidi, 11,2% nelle ghiandole sottomandibolari, e 0,8% nelle ghiandole sublinguali. L'età alla diagnosi varia da 18 a 92 anni (media 64). Non è stata trovata alcuna preferenza di genere (50,7% maschi). La maggior parte dei tumori erano da 2 a 4 cm di dimensione (47,3%). La porzione loco-regionale si è manifestata con un'incidenza del 11,9% mentre le metastasi a distanza (1,8%) sono state rare. La sopravvivenza globale a 5 e 10 anni era del 79% e 62%, rispettivamente. Per uno stadio di malattia avanzato, l'intervento chirurgico con radiazioni aveva sopravvivenza significativamente migliore rispetto alla chirurgia da sola. Quindi il trattamento congiunto di chirurgia e radiazioni aumenta significativamente la sopravvivenza anche in fase di malattia avanzata [30].

La radioterapia postoperatoria è indicata nel caso di: malattia residua micro- o macro-scopia, malattia recidiva, tumori ad alto grado e/o in stadio avanzato (interessamento dei linfonodi cervicali, del lobo profondo della parotide, del nervo facciale, rottura del tumore durante un intervento chirurgico). In questi casi la radioterapia adiuvante è in grado di migliorare il controllo loco-regionale. La radioterapia può essere indicata anche nel caso di tumori non resecabili, come alternativa alla chirurgia. Nei carcinomi delle ghiandole salivari la chemioterapia è indicata generalmente negli stadi localmente avanzati e metastatici, con un intento palliativo. Lo studio clinico di questi tumori è difficile per la loro rarità e la varietà di istotipi, per cui non sono stati definiti dei trattamenti propriamente standard. Farmaci singolarmente attivi sono: cisplatino, methotrexate, adriamicina, ciclofosfamide, fluoro uracile, vinorelbina, taxolo [28].

Proteomica

Cenni storici

La proteomica, è una disciplina estremamente vasta e completa che, attraverso una combinazione di tecnologie, permette di identificare, quantificare e caratterizzare tutte le proteine di una cellula, un tessuto o un organismo [31]. Si stima che i geni umani siano circa 100.000: se, tenendo conto dello splicing differenziale dell'mRNA e delle modifiche post-traduzionali per approssimazione da ogni gene si esplicano 10 proteine, nell'uomo le dimensioni del proteoma potrebbero essere di circa 1.000.000 di proteine; il proteoma, per tanto, è più vasto del genoma. Con una metafora ardita, si potrebbe definire una proteina come un punto di un iperspazio di cui la sequenza del gene codificante costituisce solo una delle n dimensioni [32]. Il proteoma, inoltre, presenta due livelli di complessità: a differenza del genoma che è definito unicamente da una sequenza di nucleotidi, il proteoma non si limita alla sequenza di proteine, ma tiene conto anche della loro struttura e dell'interazione tra le proteine stesse.

Infine, la variabilità del contenuto proteico di una cellula, di un tessuto o di un organismo in generale è da associare a diverse possibili cause, quali cambiamenti dovuti a processi patologici, risposte a stimoli esterni oppure ai fisiologici processi che conducono a sviluppo e maturazione dell'organismo: a differenza del genoma che può essere considerato virtualmente statico, il proteoma infatti cambia continuamente, in rapporto con lo stadio di sviluppo, la localizzazione tissutale specifica e le condizioni ambientali in cui si trova l'organismo in questione [33].

Naturalmente non sarebbe possibile affrontare questo tipo di studi senza la disponibilità delle banche dati genomiche e dei mezzi informatici che ne consentono la consultazione e, soprattutto, senza lo sviluppo di tecnologie e metodologie sofisticate di separazione e di identificazione delle proteine. Queste costituiscono l'essenza della proteomica [34].

Analisi dei marcatori

Il termine *biomarcatore* è stato introdotto nel 1989 con il significato di parametro biologico misurabile, utile per individuare variazioni para-fisiologiche oppure il rischio o la presenza di una malattia. Nel 2001 il National Institute of Health statunitense standardizzò la definizione di biomarcatore come “caratteristica misurabile capace di definire un processo come fisiologico oppure morboso e di valutare la risposta biologica ad un trattamento farmacologico” [35]. I marcatori sono sequenze proteiche e di DNA facilmente individuabili e la cui eredità può essere controllata. Sono stati identificati tramite:

- *I dimensione: isoelettrofocalizzazione*

L'IEF è un metodo elettroforetico ad alta risoluzione che separa le proteine in base al loro punto isoelettrico. Le proteine sono molecole anfotere che possono avere carica netta negativa, positiva o uguale a zero a seconda del pH dell'ambiente circostante. Il prerequisito per una separazione altamente riproducibile è la presenza di un gradiente di pH stabile e continuo con una conducibilità regolare e costante. La presenza di un gradiente di pH è fondamentale nella tecnica dell'IEF, infatti, sotto l'effetto di un campo elettrico, una proteina si muove verso il punto nel quale la sua carica netta è nulla [36]. La tecnica dei gradienti di pH immobilizzati, è basata sull'incorporazione covalente di tamponi di immobiline, determinanti il pH, nella matrice di poliacrilamide. Un'immobilina è un acido o una base debole definita dal suo valore di pK, contenente catene laterali cariche con capacità tamponanti. Il pH in ogni punto del gel è determinato dalla misura di immobiline che si trovano che si trovano in quel punto ed è stabile [36].

Nel nostro caso sono state usate strisce di gel preformati di acrilamide/bis acrilamide copolimerizzati su un supporto di plastica con la miscela di immobiline (IPG strips) che sono disponibili in commercio in forma disidratata e congelata. È possibile scegliere strips di diversa lunghezza e

con diverso gradiente di pH. Nel nostro caso la lunghezza delle strips è di 18 cm e l'intervallo di pH utilizzato è tra 3-10.

La composizione della soluzione di reidratazione contiene un agente denaturante e solubilizzante (urea), un detergente non ionico o zwitterionico (CHAPS), un agente riducente (ditiotreitolo, DTT) ed un tracciante colorato (Blu di Bromofenolo). Fondamentale è l'aggiunta del tampone con range di pH uguale a quello della strip in uso [37].

L'IEF è stata condotta sull'apparecchio IPGphor Isoelectric Focusing (Amersham Biosciences) mantenuto alla temperatura costante di 20°C mediante un sistema di raffreddamento. L'IEF viene condotta a voltaggi molto alti (7000 V).

Prima di separare le proteine in seconda dimensione è necessario equilibrare le IPG strips in una soluzione fortemente denaturante per risolubilizzare le proteine e favorire il trasferimento dalla prima alla seconda dimensione [37]. L'equilibratura avviene in due steps: nel primo le strips vengono trattate con una soluzione contenente sodio dodecilsolfato (SDS) e DTT, per denaturare e ridurre le proteine; nel secondo si usa la stessa soluzione in cui il DTT è sostituito dalla iodoacetamide, per l'alchilazione dei gruppi solfidrilici e per inibirne un'eventuale riossidazione.

- *II dimensione: L'elettroforesi bidimensionale in presenza di SDS*

Elettroforesi di proteine su gel di acrilamide (**PAGE**) condotta in presenza di sodio dodecil-solfato (**SDS**) su di un gel discontinuo. Questa tecnica, comunemente indicata come **SDS-PAGE**, è stata descritta per la prima volta da U.K. Laemmli nel 1970 e viene ampiamente utilizzata. Il tampone di corsa in cui il gel è immerso è Tris-HCl-glicina a pH 8,3 [38]. Il campione di proteine viene caricato nel pozzetto in genere 25/30 µg insieme ad una piccola quantità di colorante inerte (**blu di bromo fenolo** 3',3'',5',5''-tetrabromofenolosulfonftaleine) con una carica negativa, che

migra velocemente nel campo elettrico e consente di seguire l'andamento della corsa elettroforetica. Per la corsa elettroforetica si utilizza il RUNNING BUFFER 10X (Tris-base 25mM, Glicina 192 mM, SDS 0,1%) diluito 1:10; la diluizione. La diluizione viene fatta il giorno precedente e si mantiene il tampone a 4 fino al giorno successivo [38]. L'elettroforesi viene generalmente fermata quando il blu di bromo fenolo ha raggiunto l'estremità inferiore del gel, perché questo colorante, che non interagisce con le proteine, ha un peso molecolare di circa 670 Da ed è quindi ragionevole assumere che quando il blu è a fine corsa la maggior parte delle proteine siano ancora all'interno del gel. Una volta avvenuta la migrazione, le proteine contenute nella miscela e separate su gel si saranno separate in **spot** [38].

In questo modo i filamenti si comportano essenzialmente come filamenti carichi negativamente: la carica intrinseca della singola proteina diviene trascurabile rispetto alla carica conferita dall'SDS e quindi la migrazione avviene in base alla lunghezza della proteina (oppure essenzialmente alla massa molecolare) [38]. L'analisi elettroforetica, è stata condotta su una camera verticale Mini-Protean (Bio Rad). La corsa elettroforetica è stata condotta a 80 Volts costanti per 10 minuti e a 160 Volts costanti fino al termine della corsa. Quindi nell'SDS-PAGE le proteine a minor peso molecolare si muovono più velocemente, mentre quelle a maggior peso molecolare migrano più lentamente. Questa tecnica consente di determinare, sia pur in maniera approssimativa, la **massa molecolare apparente** di una proteina. Infatti se si confronta la mobilità relativa di una proteina X con una retta costruita correndo in un'altra corsia dello stesso gel una miscela di proteina di massa nota, dette **marcatori di peso molecolare**, è possibile risalire alla massa apparente della proteina X con una precisione di 0,5-10 kDa [38].

In uno studio precedente effettuato nel Laboratorio di Proteomica del Dipartimento di Farmacia dell'Università di Pisa erano stati fatti due

gruppi (*pool*), uno rappresentato dalla frazione proteica dell'ago aspirato prelevato dalla parotide di pazienti affetti da adenoma pleomorfo e l'altro dalla parotide di pazienti affetti da carcinomi. Ciascuno di essi era stato sottoposto a 2-DE eseguita in triplo. I gel sono stati confrontati tramite programma software Progenesis SameSpot (Non linear – Dynamics), che contestualmente effettua l'analisi di varianza dei gruppi (ANOVA) ricavando il p-value e il False Discovery Rate (q-value). È stata effettuata un'indagine comparativa tra i gel del gruppo di adenoma pleomorfo e carcinoma, selezionando e identificando gli spot proteici con un grado di differenza tra i due gruppi maggiore di 2 volte, chiamato fold variation (FV), un p.value < 0,05 e un q-value < 0,05 (Fig. 2).

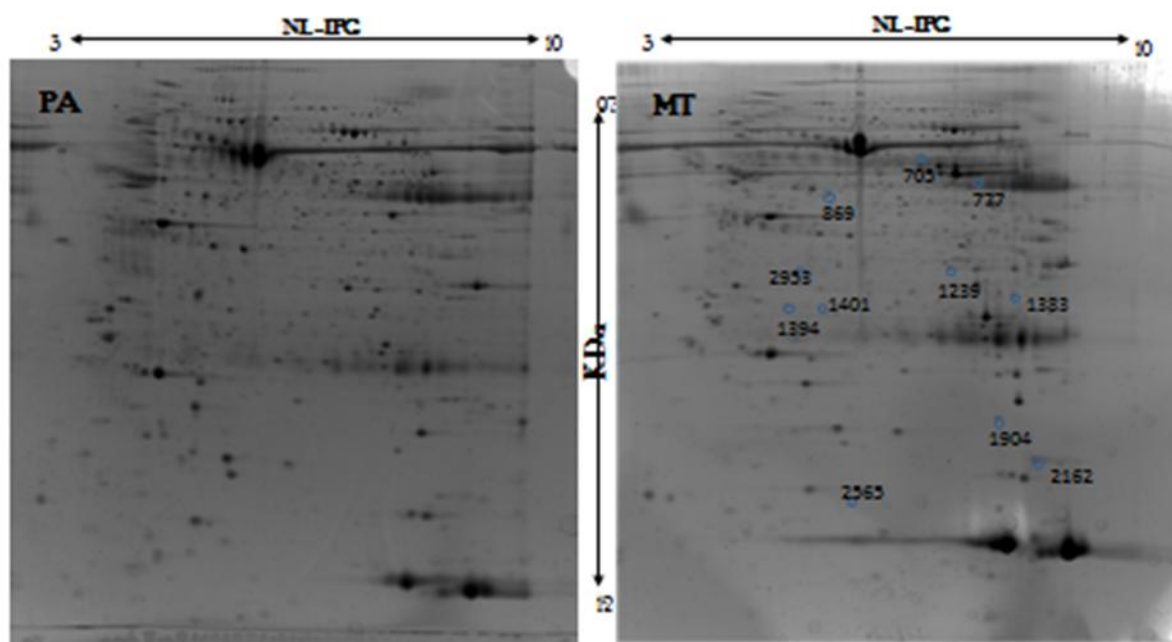


Figura 2 Patterns 2DE di campioni di parotidi umane di PA e MT. Le proteine differenzialmente espresse sono cerchiare.

- *La spettrometria di massa*

La spettrometria di massa è una tecnica analitica potente usata per identificare prodotti incogniti, per determinazioni quantitative di composti noti e per chiarire le proprietà strutturali e chimiche delle molecole. Tutto questo può essere effettuato con quantità di campione estremamente limitate a concentrazioni molto basse in miscele complesse [39]. Viene usata per stabilire la sequenza di biopolimeri come proteine e oligosaccaridi. Ricordiamo brevemente che uno spettrometro di massa è costituito dalle seguenti unità modulari: un sistema di introduzione del campione; un sistema di produzione degli ioni corrispondenti alle molecole neutre introdotte (sorgente); uno o più sistemi di separazione, in funzione del rapporto massa/carica, degli ioni prodotti e di eventuali frammenti da essi generati (analizzatori); un rivelatore con relativa amplificazione dei segnali gestito da potenti sistemi informatici [39]. L'identificazione di una proteina mediante spettrometria di massa avviene, come nel caso del *fingerprint*, attraverso l'analisi dei peptidi generati utilizzando proteasi specifiche (tripsina, Asp-N proteinasi, Glu-C proteinasi). In questo caso, tuttavia, i peptidi sono caratterizzati non più dai loro parametri chimico-fisici come polielettroliti, ma più semplicemente dalla loro massa attraverso la determinazione, effettuata dallo spettrometro di massa, dei loro pesi molecolari [40]. Il principio dell'identificazione delle proteine mediante spettrometria di massa è abbastanza semplice e si basa sull'osservazione che proteine con una diversa sequenza amminoacidica, in seguito all'azione di una proteasi specifica, generano un insieme discreto di peptidi, definiti dalla loro massa, che è unico per quella proteina [40]. Per questo tipo di analisi viene utilizzato come sistema di ionizzazione il MALDI (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization*), in cui si sfrutta la radiazione laser per indurre la produzione di ioni molecolari protonati degli analiti

opportunamente incorporati in matrici di natura organica. Di solito le sorgenti MALDI sono accoppiate con analizzatori a tempo di volo (*Time Of Flight*, TOF) che misurano il rapporto massa/carica degli ioni generati nella sorgente sulla base del tempo che questi impiegano nel percorrere uno spazio definito in assenza di campi elettrici e magnetici [40]. Con questi apparecchi, purché dotati di particolari accorgimenti per evitare dispersioni di energia degli ioni, si riesce a ottenere una misura delle masse dei peptidi con una precisione alla seconda cifra decimale. Gli spettrometri di massa che consentono analisi di questo tipo nel tempo si sono evoluti in termini di complessità, e quindi di costi, dimensioni e sensibilità. Dagli strumenti dotati di due analizzatori magnetici (tandem MS) della metà degli anni ottanta si è passati a quelli dotati di più analizzatori di tipo quadrupolo (Q), di trappola ionica (IT o FT-ICR), di quadrupolo e TOF ortogonale (Q-TOF) e di due analizzatori a tempo di volo (TOF-TOF) [40]. Occorre notare che solo nel caso di quest'ultimo strumento, peraltro da poco disponibile commercialmente, viene utilizzata la sorgente MALDI, laddove nel caso degli strumenti con analizzatori quadrupolari si usa la sorgente a ionizzazione per elettro-nebulizzazione (*Electro-Spray Ionization*, ESI) [40]. In questo tipo di sorgente gli analiti in soluzione, opportunamente purificati da sali con un passaggio cromatografico, vengono introdotti attraverso un capillare nella sorgente stessa che, per effetto combinato del vuoto spinto e di un'opportuna differenza di potenziale, genera dal campione nebulizzato ioni a carica multipla [41]. Questo tipo di sorgente è stato successivamente ottimizzato con l'introduzione del sistema nanospray che, facendo uso di un microcapillare con flussi di qualche nl/min, consente un tempo di residenza in sorgente dell'analita dell'ordine dei minuti, con un notevole incremento del rapporto segnale/rumore. Gli spettrometri ES-nanospray con i doppi analizzatori, in particolare quadrupolo e tempo di volo ortogonale, collegati a un cromatografo capillare hanno rivoluzionato la

pur breve storia della proteomica [41]. Gli spot trovati differenzialmente espressi sono stati tagliati e sottoposti ad analisi di spettrometria di massa per la loro identificazione. I risultati sono riportati in tabella I.

n°	Nome della proteina	Accesso	Nome del Gene	Mr/pI Teorico	Mr/pI Calcolato	a	b	c	Peptidi identificati	d	p-value
705	Catena Ig alfa-1 regione C	P01876	IGHA1	37653.8/6.1	56244/5.7	3	12	28.6	(R) DASGVTFWTWTPSSGK(S)	↑2.1	3,00E-03
777	Fibrinogeno beta chain	P02675	FGB	55928.6/8.5	51444/5.8	12	27	75.8	(K)LESDVSAQmEYcRT	↑2.8	3,84E-05
869	4 trimetilaminoutiraldeide deidrogenasi	P49189	ALDH9A1	53802.0/5.7	44867/5.1	7	17	83.2	(R) VEPADASGTEKAFEPATGR(V)	↓2.1	2,00E-03
1239	Annessina A1	P04083	ANXA1	38715.9/6.6	34351/5.7	18	45	102.5	(R) KGTDVTILTT(R)	↑2.5	4,00E-03
1383	Guanina nucleotide - proteina binding subunità beta-2- simile	P63244	GNB2L1	35077.0/7.6	31681/6.0	4	11	62.2	(K)DVLSVAFSSDNR(Q)	↓3.0	4,00E-03
1394	Proteasoma complesso attivatore subunità 2	Q9UL46	P5MEZ	27402.3/5.5	31366/4.8	3	15	56.1	(R)ALVHERDEAAAYGELR(A)	↓3.2	5,68E-04
1401	F - actina – capping protein subunit beta	P47756	CAPZB	31351.6/5.4	31209/5.1	9	39	101	(K)SGSGTmNLGGSLTR(Q)	↓3.0	3,00E-03
1904	Alfa - cristallin catena B	P02511	CRYAB	20159.5/6.7	22791/5.9	4	14	47.4	(K)HFSPEELK(V)	↑6.8	8,53E-04
2162	Cofilina - 1 OS	P23528	CFL1	18503.2/8.2	19797/6.6	5	39	78	(K)LGGSAVISLEGKPL(-)	↓4.0	2,00E-03
2565	Proteina S100 - A9	P06702	S100A9	13242.37/5.7	<6600/5.3	3	32	78.2	(K)VIEHImEDLDTNADK(Q)	↓4.8	2,23E-04
2953	F - actina - capping protein subunit alfa - 1	P52907	CAPZA1	32923.2/5.4	34325/4.9	5	26	87.1	(K)DVQDSLTVSNEAQTAKE(E)	↓2.9	4,00E-03

Tabella 1 Identificazione degli spot differenzialmente espressi. a: Matched Peptides **b:** coverage % **c:** best ion score **d:** rapporto PA vs MT

SCOPO DELLA TESI

Nella grande varietà di tumori a livello delle ghiandole salivari, in particolare le parotidee, spesso, risulta difficile una diagnosi che possa distinguere i diversi istotipi tra di loro, in particolare tra benigni e maligni, le cui differenze istologiche e le caratteristiche cliniche non forniscono una base sufficiente per una diagnosi precisa.

Lo scopo della tesi è quello di validare, tramite Western Blot, biomarcatori più possibilmente specifici per le proteine che vengono espresse esclusivamente durante il processo patologico dei tumori delle ghiandole parotidee, in modo da avere una diagnosi più precisa ma soprattutto un trattamento più rapido e mirato.

In studi precedenti effettuati nel Laboratorio di Proteomica del Dipartimento di Farmacia dell'Università di Pisa sono state identificate 11 proteine risultate essere differenzialmente espresse in campioni di un pool di pazienti di AP confrontati con MT (vedi tabella 1). Tra queste si è deciso di validare 4 proteine (ANXA 1, CFL 1, CAPZa1, CAPXb) utilizzando la tecnica del Western Blot.

MATERIALI E METODI

Pazienti e raccolta dei campioni

Nello studio sono stati reclutati 17 pazienti affetti da tumori maligni quali carcinoma mucoepidermoide e carcinoma adenoideocistico e 27 con tumore benigno quale adenoma pleomorfo opportunamente selezionati dall'Azienda Ospedaliera Pisana, U.O. ORL Universitaria 1^a (AOUP), diretta dal Prof. Stefano Sellari Franceschini, nel periodo compreso tra il gennaio 2010 ed il marzo 2015. Il progetto di ricerca è stato approvato dal Comitato Etico dell'AOUP e per tutti i pazienti è stato ottenuto il consenso informato. Le diagnosi sono state confermate dall'analisi istologica sullo stesso pezzo su cui è stato fatto l'agoaspirato. Una volta eseguita l'asportazione chirurgica della lesione è stato praticato un lavaggio con soluzione fisiologica e subito dopo si è effettuato l'esecuzione di un ago aspirato sul pezzo anatomico sia sulla porzione affetta da tumore che sul parenchima sano.

Preparazione dei campioni

Una volta scongelati i campioni sperimentali, si centrifugano per 10 minuti a 4°C a 2300 rpm, per rimuovere i detriti cellulari. Successivamente si preleva il sovranatante e si procede con la precipitazione in TCA (Acido tricloroacetico)/Acetone.

Precipitazione delle proteine in acido tricloroacetico

Si prepara TCA al 20%, DTT 0,1%, successivamente si aggiunge al campione un eguale volume di TCA/DTT, si vortexa e si mette in ghiaccio per 30 minuti, quindi si centrifuga per 10 minuti a 4 °C a 13500 rpm e si aspiro il sovranatante. A quest'ultimo si aggiungono 1.5 mL di acetone a freddo e si centrifuga. Questi ultimi due passaggi si ripetono 3 volte, per un totale di 4 centrifughe. Si asciuga il pellet nella Speedvac, un evaporatore centrifugo automatico; poi si aggiunge un volume di soluzione di reidratazione (Urea /M; Tiourea 2M; Chaps 4%; Blu di Bromofenolo; H₂O mQ) in DTT 60 mM e si lascia in incubazione per 30 minuti.

Si centrifuga il tutto a 13500 rpm, a 20°C per 5 minuti e una volta che si è formato il pellet si preleva il sovrantante.

Dosaggio proteico RC/DC Biorad

Il dosaggio proteico RC/DC è un saggio colorimetrico per la quantificazione delle proteine basato come principio sul saggio di Lowry, ma modificato per diventare compatibile ad alte concentrazioni di agenti riducenti (RC) e detergenti (DC). La presenza di una o più di queste sostanze può variare la risposta della proteina ai reagenti del saggio. Dunque la proteina standard, con la quale costruiamo la nostra curva di riferimento, dovrà essere preparata nello stesso tampone del campione proteico di nostro interesse. Nel nostro caso la proteina standard albumina bovina, è sospesa nella soluzione di reidratazione. Vengono preparate quattro concentrazioni (con volume di 25µl) di proteina standard (0,2-0,4-0,8-1,5 mg/ml) che rientrano nell'intervallo di sensibilità del metodo. Il dosaggio viene effettuato in doppio, a temperatura ambiente. Agli standard e al campione sono aggiunti 125µl di Reagente I, poi si vortexano e si lasciano ad incubare per 1 minuto. Dopodichè si aggiungono 125µl del Reagente II, si vortexa e si attende 1 minuto, infine centrifugo per 5 minuti a 12000 rpm a 20°C. Finita la centrifuga aspiro il sovrantante. Poi aggiungo 125µl di Reagente I, vortexo e metto in incubazione per 1 minuto, quindi aggiungo 40µl di Reagente II, vortexo e attendo 1 minuto, dopodichè centrifugo a 12000 rpm per 5 minuti a 20°C, poi aspiro il sovrantante. Aggiungo 127µl di soluzione A* (20µlS+1000µlA), vortexo e metto in incubazione per 5 minuti. Infine aggiungo 1 ml di soluzione B e vortexo. Leggo a 750 nm il valore dell'assorbanza dopo 15 minuti. La retta di taratura, ottenuta con concentrazioni note di BSA (standard), ha consentito di estrapolare, dai dati di assorbanza dei campioni, le relative concentrazioni di proteine, basandosi sulla legge di Lambert-Beer, che stabilisce una proporzionalità diretta tra assorbanza e concentrazione proteica di una soluzione, e che graficamente assume un andamento rettilineo. Le concentrazioni

finali sono espresse in mg/ml e vengono calcolate come rapporto tra l'assorbanza del campione e l'assorbanza della retta standard attraverso programma di calcolo Excel.

Western Blot

Questa tecnica è largamente impiegata per visualizzare e dosare semi-quantitativamente una proteina presente in una miscela (tipicamente un estratto cellulare o un siero) immobilizzata su membrana. Aliquote di estratti proteici compresi tra 10 e 30 ug vengono separate per SDS-PAGE e quindi trasferite su fogli di nitrocellulosa attraverso la tecnica del Western Blot. Una volta fissate nella membrana, le proteine possono poi essere analizzate per mezzo di anticorpi specifici diretti contro epitopi antigenici esposti dalle proteine stesse. Il trasferimento delle proteine dal gel alla membrana di nitrocellulosa è stato effettuato mediante un sistema continuo assemblato in un apposito strumento (Trans-Blot[®]Turbo[™] Transfer System, Bio-Rad). È stato allestito un sandwich costituito, nell'ordine dall'anodo al catodo, da 3 fogli di carta da filtro, dalla membrana di nitrocellulosa, dal gel di poliacrilamide e da altri 3 fogli di carta da filtro. La membrana di nitrocellulosa è la Tran-Blot[®]**Turbo**[™] Transfer Pack Mini Format 0,2µm PVDF, Single Application della Bio Rad. Si adagia al centro della cassetta base dell'apparecchio la membrana di nitrocellulosa, poi si stende delicatamente il gel sul foglio di nitrocellulosa e con il rullo rimuovono bolle d'aria. A questo punto si completa il sandwich adagiando sopra l'ultimi strati di fogli che fanno da conduttori di ioni. Si chiude la cassetta che inserisce nell'apparecchio e si applica una differenza di potenziale di 25V per 7 minuti. Al termine del trasferimento si colora la membrana con ruthenium II tris (bathophenanthroline disulfonate) tetrasodium preparato con una soluzione di fissaggio 1% acido fosforico e 30% etanolo. Il RuPB è un colorante sensibile, lineare, stabile nel tempo e compatibile con la chemiluminescenza. L'immagine

viene acquisita con lo strumento “ImageQuant LAS 4000” (GE-Healthcare). L’analisi è stata effettuata con il software “ImageQuant TL”.

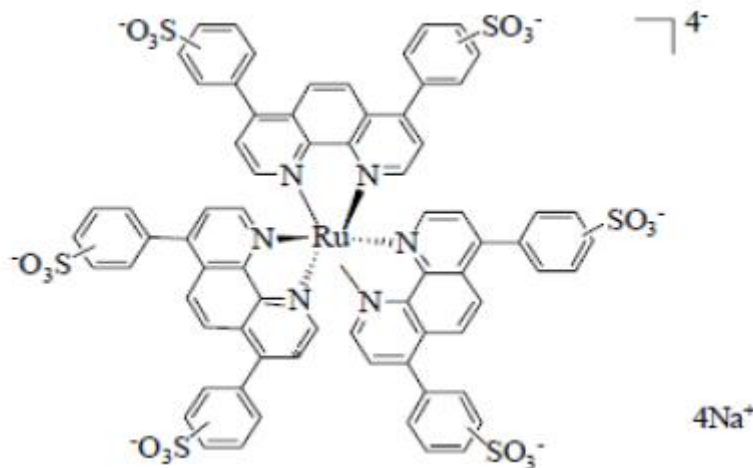


Figura 3. Struttura molecolare del rutenio (RuPB) [Sunatech Inc.]

Dopo l’acquisizione si rimettono le membrane nelle vaschette così che restanti siti di legame per le proteine sulla superficie della membrana sono stati bloccati lasciando la membrana in agitazione over night a 4°C in una soluzione contenente PBS/Milk/Tween20 (Milk 30%; Tween20 0,2% in PBS). La membrana con l’antigene adsorbito è stata quindi incubata con un anticorpo primario, diluito 1:1000 e lasciato ad incubare tutta la notte a 4°C in agitazione. L’anticorpo non legato viene rimosso mediante 4 lavaggi in PBS/Tween/Milk da 10 min ciascuno.

L’anticorpo legato, o meglio il complesso antigene-anticorpo, presente sul filtro viene rivelato utilizzando un **anticorpo secondario**, diretto contro l’anticorpo primario. Come anticorpo secondario si è utilizzato un anticorpo anti-coniglio perossidasi coniugato diluito 1:10000, lasciato ad incubare per 1 h. Dopodiché si effettuano 4 lavaggi con PBS/Milk/Tween per 10 minuti; 2 lavaggi con PBS per 5 minuti; 1 lavaggio con H₂O per 1 minuto. L’ultima fase del western blot è quindi

la rilevazione delle bande con un sistema ottico ed eventualmente la loro misura densitometrica per ottenere una stima semiquantitativa dell'abbondanza relativa delle bande. Il sistema oggi più comunemente impiegato è quello della **chemiluminescenza** (enhanced chemiluminescence, **ECL**) che sfrutta sistemi in cui il prodotto luminescente è visualizzato direttamente con un sistema combinato di cattura e analisi dell'immagine mediante una macchina fotografica digitale. Quindi si incuba la membrana per 1 min con il Luminolo. Ricopro e si acquisisce l'immagine utilizzando lo strumento "ImageQuant LAS 4000" (GE-Healthcare). L'analisi è stata effettuata con il software "ImageQuant TL".

Analisi Blot (statistica)

A completamento delle analisi effettuate tramite esperimenti condotti in laboratorio abbiamo inserito i risultati nel programma Excel dove sono stati esaminati ed elaborati per avere un'analisi statistica dei valori risultati significativi sulla differenza di densità tra le bande immunoreattive dei due differenti tumori ricavati dal test t di Student con il valore $p \leq 0,05$.

RISULTATI E DISCUSSIONE

I tumori della parotide compongono un gruppo estremamente numeroso ed eterogeneo di malattie; a seconda del quadro istologico con cui vengono caratterizzati i tumori queste malattie presentano, secondo i casi, entità anche molto diverse fra loro sia per comportamento biologico che per storia naturale. A tutt'oggi risulta decisamente molto difficile costruire una schema classificativo di queste lesioni e di conseguenza poter interpretare e definire una specifica diagnosi tra tumore benigno e tumore maligno.

Il nostro gruppo con la collaborazione dell'Azienda Ospedaliera Universitaria Pisana ha utilizzato l'approccio proteomico sui campioni ricavati dall'ago aspirato praticato su una porzione della ghiandola parotidea interessata dalla lesione e sono state identificate una serie di proteine differenzialmente espresse. Tramite l'elettroforesi bidimensionali erano state selezionate una serie di proteine con un fold variation ≥ 2 da identificare tramite spettrometria di massa. Tra quelle identificate con successo se ne sono estrapolate una serie che potevano essere giudicate interessanti dal punto di vista funzionale. Grazie al Western Blot per ogni proteina è stata determinata la densità ottica della banda immunoreattiva comparando la media dei valori \pm l'errore standar. Il t Test ha permesso di valutare la significatività della differenza di intensità delle bande tra PA ed MT, differenza che è risultata significativa con un valore $P \leq 0,05$. Le proteine espresse CAPZ A e CAPZ B non mostrano differenze significative tra MT vs PA, mentre si rileva un'importante differenza confrontando MT vs tessuto sano e PA vs tessuto sano.

Anxa1

Dall'analisi del Western Blot l'ANXA1 è stata trovata iperespressa nell'adenoma pleomorfo rispetto al tumore maligno di 6.9 volte (Fig. 3)

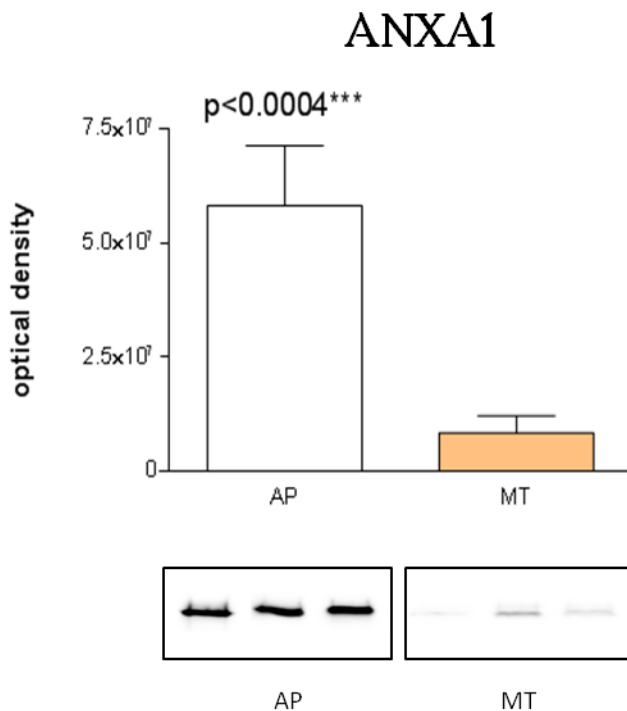


Figura 3: Confronto dell'espressione di ANXA1 in AP dove è maggiormente espresso rispetto a MT

Le annessine, anche note come lipocortine, sono una famiglia di proteine strutturalmente correlate che si legano in maniera calcio-dipendente ai fosfolipidi anionici [42]. Sono state definite 160 proteine annessiniche presenti in più di 65 specie differenti, dai funghi, alle piante e ai grandi vertebrati, il che suggerisce che queste proteine hanno un ruolo cellulare fondamentale sia nel citosol che nella membrana plasmatica. [43, 44]. Molte annessine sono significativamente presenti a livello intracellulare, fino a raggiungere il 2% delle proteine cellulari totali. Il ruolo delle annessine non è stato ancora dimostrato in modo chiaro, benché siano state proposte una serie di funzioni biologiche tra le quali attività antinfiammatoria e anticoagulante.

Il coinvolgimento di alcune annessine nell'aggregazione e nella fusione delle membrane, nell'endocitosi e nell'esocitosi è ben documentata ma non dimostrata in vivo. Alcune annessine sono espresse in modo dipendente dalla crescita e sono bersagli per le chinasi cellulari in vivo, suggerendo un loro coinvolgimento nel differenziamento e nella mitogenesi [42].

Grazie alla partecipazione in numerosi processi di segnale cellulare, le annessine sono coinvolte nella patogenesi di diverse malattie, incluse quelle croniche causate da infiammazione, cancro e malattie auto-immuni. [45]. Auto-anticorpi contro ANXA1 sono stati ritrovati in pazienti con disordini auto-immuni come il lupus eritematoso, l'artrite reumatoide [46, 47] e il morbo di Crohn [48]. Bassi livelli di espressione di ANXA1 sono stati riscontrati nel fluido bronco-alveolare in pazienti con fibrosi cistica, indicando la loro sensibilità all'infiammazione polmonare [50]. La sua espressione sembra essere collegata anche al morbo di Parkinson [51] e alle lesioni delle placche nella sclerosi multipla [50].

L'annessina A1 (ANXA1), una proteina di 37 kDa è coinvolta in diversi processi fisiologici e patologici, inclusi la crescita e il differenziamento cellulare, l'apoptosi, la fusione di membrane, e processi di esocitosi ed endocitosi [52]. È stato dimostrato come l'ANXA1 sia capace di mimare gli effetti antinfiammatori dei glucocorticoidi in diversi modelli sperimentali sia *in vivo* sia *in vitro* [53]. Descritta originariamente come una proteina inibitrice della fosfolipasi A2 (PLA2), l'ANXA1 può agire su molti elementi della reazione infiammatoria oltre che sul metabolismo dell'acido arachidonico. Diversi dati mostrano che l'ANXA1 può agire specificamente con la PLA2 citosolica sia attraverso l'inibizione diretta dell'enzima indotta da citochine [54], sia attraverso la soppressione dell'attivazione dell'enzima, dovuta al legame della proteina ai fosfolipidi di membrana, che ne impedisce l'accesso al substrato [55]. ANXA1 inibisce l'espressione e/o l'attività di altri enzimi infiammatori come iNOS, nei macrofagi, e COX-2, nella microglia attivata [56, 57] hanno dimostrato che l'espressione dell'ANXA1 può contribuire all'effetto pro-apoptotico di TRAIL. L'ANXA1 infatti, è espressa nel carcinoma della tiroide, ma non nel tessuto

tiroideo di controllo. TRAIL induce apoptosi in modo tempo-e dose-dipendente nelle cellule di carcinoma follicolare della tiroide (FRO). L'aumento dell'attività della caspasi-3 conferma l'effetto di TRAIL che stimola anche l'espressione citosolica dell'annexina A1 in modo tempo-dipendente e induce la traslocazione della proteina alla membrana cellulare. La trasfezione delle cellule FRO con small interference(si) RNAs diretti contro ANXA1 inibisce significativamente l'espressione della proteina e l'apoptosi indotta da TRAIL.

Al fine di determinare il possibile coinvolgimento di ANXA1 nell'eziopatogenesi del carcinoma orale a cellule squamose (OSCC) [58], hanno recentemente valutato i profili di espressione della proteina in lesioni orali pre-maligne (OPL) e in lesioni OSCC e correlato i risultati ottenuti con variabili clinico-patologiche. Una marcata riduzione dell'espressione di ANXA1 è stata riscontrata sulla membrana plasmatica

di cellule epiteliali provenienti da lesioni in OSCC e OPL rispetto a cellule epiteliali di tessuto non affetto da lesioni. Inoltre, la perdita di ANXA1 a livello delle membrane plasmatiche era significativamente correlata a ridotto differenziamento delle cellule epiteliali. Gli autori hanno suggerito che la perdita di espressione di ANXA1 è un evento molto frequente e precoce durante la carcinogenesi del tumore della cavità orale e che la proteina sia importante nel mantenimento del differenziamento delle cellule epiteliali nell'OSCC [58].

CapzA1 e CapzB

Dalla'analisi del Western blot della CAPZA1 è risultata iperespressa, nel confronto tra tumore maligno e tessuto sano, di 87,1 volte nel tumore; mentre nel confronto tra Adenoma Pleomorfo e tessuto sano è risultata iperespressa di 22,9 volte nell'AP.(Figura 4)

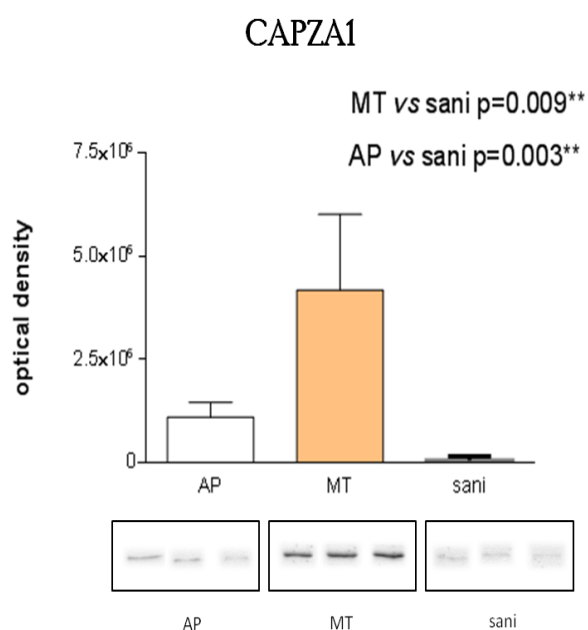


Fig. 4 Confronto dell'espressione di CAPZA1 in AP, MT e tessuto sano. Si noti una notevole iperespressione di CAPZA1 nel tumore rispetto all'AP e al tessuto sano

In riferimento ad un recente studio sulla proteina Capz A1 viene dimostrato che essa è indicatrice di buona prognosi nella cura del cancro gastrico ed è associata ad una diminuzione delle cellule tumorali con conseguente riduzione di invasività dei tessuti circostanti [59].

Espressione della proteina CAPZA1 è stata rilevata nel tessuto estratto da porzioni già lesionate. L'intensità di espressione Capz nel citoplasma delle cellule tumorali si presenta variata. In tutti i casi con valori compresi tra 0 e 1 + sono stati considerati negativi per la sovra espressione di CAPZA1 mentre quelli compresi tra 2+ , 3+ e 4+ sono stati considerati positivi . Le cellule normali e metaplastiche epiteliali , cellule muscolari lisce , cellule endoteliali vascolari e cellule plasmatiche risultavano debolmente positive [59].

I pazienti sottoposti a studio sono stati suddivisi in due gruppi: quello con CAPZA1 iperespressa (CAPZA1-OE) e quello con CAPZA1 sottoespressa (CAPZA1-UE). Nel primo caso CAPZA1-OE è stato associato dal punto di vista istologico a istotipi ben differenziati, moderatamente differenziati o mucinosi, secondo la classificazione della WHO ($p < 0.01$); tuttavia, non vi era alcuna differenza statisticamente rilevante in termini di tumori intestinali secondo la classificazione Lauren ($p = 0,37$). La CAPZA1 iperespressa è correlata alle dimensioni del tumore più piccolo (3,7 cm) rispetto alla CAPZA1 sottoespressa (4,8 cm) ($p < 0.01$). La CAPZA1 iperespressa ha mostrato un tasso significativamente più alto negli stadi T1 e T2 (62,1 vs 14,4%) rispetto alla CAPZA1 sottoespressa (40,3 vs 7,8%), e un tasso più basso di cancro negli stadi T3 e T4 (41,9 vs . 15,9% e 10,1 vs. 7,7%, rispettivamente) ($p < 0.01$) [59].

Inoltre, l'assenza di metastasi nei pazienti con CAPZA1 iperespressa (72,8%) era significativamente superiore a quelli con CPAZA1 sottoespressa (56,6%) ($p = 0,01$). tuttavia, il tasso di recidiva del CAPZA1 sottoespressa era significativamente più alto rispetto a quello di CAPZA1 iperespressa (25,6 vs 13,8%), così come il tasso di morte per cancro (21,7 vs 10,8%) [59].

Tra i pazienti 23,6 % sono morti, 50 dei quali sono morti di recidiva del tumore . L'analisi di sopravvivenza di Kaplan - Meier è stata eseguita per confrontare l'esito dei pazienti nel gruppo CAPZA1 sottoespressa a quello dei pazienti nel gruppo CAPZA1 iperespressa . I pazienti con CAPZA 1 iperespressa hanno mostrato un tempo di sopravvivenza più lungo ($68 \pm 1,3$ mesi) rispetto ai

pazienti con CAPZA - 1 sottoespressa ($58 \pm 2,1$ mesi). La differenza tra i due gruppi è risultata significativa (log-rank test , $p < 0.01$) [59].

Nel precedente studio di proteomica, CAPZA1 è risultato essere iperespressa nel tessuto interessato dal cancro gastrico rispetto al tessuto normale. I risultati hanno mostrato che CAPZA1 iperespressa è associata con l'istologico ben differenziato, le dimensioni del tumore sono più piccole, stadio T1, assenza di metastasi LN, tasso più basso di recidiva e tempo di sopravvivenza più lungo. Nella modellazione in vitro il cancro gastrico ha mostrato che la iperespressione di CAPZA1 sopprime marcatamente la migrazione cellulare e l'infiltrazione nei tessuti circostanti e che la riduzione della CAPZA1 ha l'effetto opposto.

Collettivamente, questi risultati suggeriscono che CAPZA1 può avere un valore prognostico nel carcinoma gastrico [59].

Si è riscontrata una differente espressione delle CAPZA1 nel carcinoma orale a cellule squamose in cui è stato rilevato un aumento di 10 volte maggiore nell'espressione di CAPZA1 nei carcinomi orali a cellule squamose HPV18 - positivo rispetto ad altri tumori HPV18 - positivo , anche se non è stato rilevato l'iperespressione a livello di RNA [59].

La ricerca ha dimostrato che CAPZA1 risulta iperespressa in più del 20 % di glioblastomi [60].

CAPZA1 è stata anche coinvolta nel cancro a cellule renali e studiata utilizzando PROTEOMEX , un approccio che combina l'analisi proteomica convenzionale con lo screening sierologico [61].

Uno studio ha cercato di identificare i marcatori molecolari più specifici per il melanoma maligno, facilitando così la diagnosi di melanoma e il conseguente trattamento. È stata analizzata la differente espressione di CAPZA1 tra le cellule di melanoma e melanociti normali. Inoltre, poiché CAPZA1, è coinvolta nella motilità cellulare, che è alla base dell' infiltrazione e metastasi del cancro umano, può anche essere un nuovo bersaglio per terapie anti-metastasi [62, 63].

Sebbene le analisi abbiano suggerito che CAPZA1 era altamente espressa nei melanomi, non è stata rilevata nessuna differenza significativa nell'espressione di

CAPZA1 tra melanomi maligni e benigni ($p = 0,21$). Questa discrepanza può essere dovuto al fatto che nei tumori benigni CAPZA1 è espressa a livelli comparabili al melanoma, ma non a melanociti normali [64].

Dalla'analisi del Western blot della CAPZB è risultata iperespressa, nel confronto tra tumore maligno e tessuto sano, di 97,3 volte nel tumore; mentre nel confronto tra Adenoma Pleomorfo e tessuto sano è risultata iperespressa di 53,3 volte nell'AP.(Figura 5)

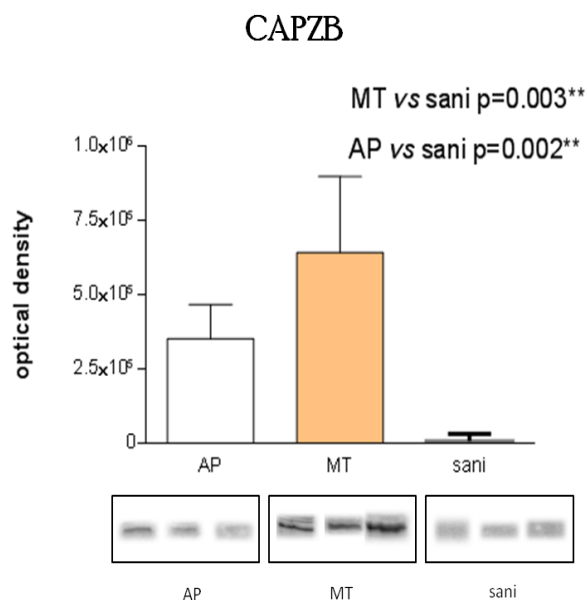


Fig 5. Confronto dell'espressione di CAPZB in AP, MT e tessuto sano. Si noti una notevole iperespressione di CAPZB nel tumore rispetto all'AP e al tessuto sano

Uno studio di associazione genoma-wide(GWAS)in Germania ha riportato 4 loci genetici associati con il volume della tiroide e con il rischio di comparsa del gozzo [65]. Sono stati identificati due loci, di questi 4, indipendentemente

associati al rischio di gozzo e sono stati trovati all'interno della regione del cromosoma 1p36 della proteina CAPZB.

Questa proteina è essenziale per la motilità actina-dipendente in filopodi nonché in lamellopodii, entrambi i quali sono importanti per la locomozione in molti tipi di cellule migranti [66, 67].

In uno studio su pazienti affetti da depressione nella fase acuta sono state identificate otto proteine con valori diversi rispetto ai pazienti sani. Tra queste otto proteine è stata rilevata la CaPZB con valori più alti nei pazienti con depressione maggiore rispetto alla norma. Questi risultati suggeriscono che i processi di infiammazione, stress ossidativo e neurogenesi sono coinvolti nella psicopatologia della depressione acuta. Questo biomarcatore ci conduce alle vie dello stress ossidativo e infiammatorio che possono contribuire all'insorgenza depressione acuta e provocare anche disturbi al sistema circolatorio [68].

Cofilina (CFL 1)

Dall'analisi del Western Blot della CFL1 è stata trovata iperespressa nel tumore maligno rispetto all'adenoma pleomorfo di 2,9 volte (Fig. 3)

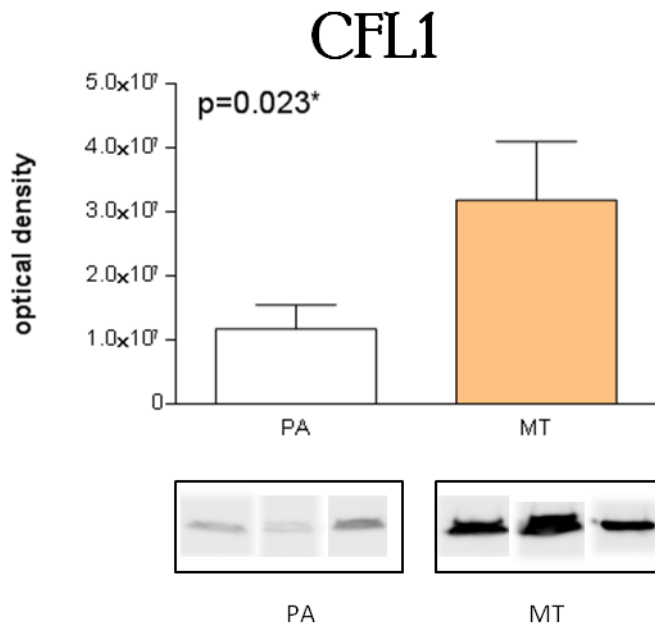


Figura 6: Confronto dell'espressione di CFL1 in MT dove è maggiormente espresso rispetto a PA

Cofilina-1 è una proteina legame-actina che svolge un ruolo essenziale nella regolazione delle dinamiche di actina e di riorganizzazione stimolando la separazione e la depolimerizzazione dei filamenti di actina [69], ed è stata identificata come un fattore determinante della trombina – indotta da RelA / p65 traslocazione nucleare attraverso modifiche delle dinamiche di actina [70].

Si pensa che la Cofilina-1 possa svolgere un ruolo essenziale nella regolazione della traslocazione nucleare del RelA / p65 nelle cellule endoteliali trombina-

trattate [8]. In risposta a stimoli specifici, la traslocazione di NF- κ B (p65) dal citoplasma al nucleo richiede alterazioni dinamiche del citoscheletro di actina. Sia la stabilizzazione che la destabilizzazione del citoscheletro inibiscono l'accumulo nucleare RelA / p65 [71]. La Cofilin1 è una proteina ubiquitaria ed è essenziale per l'allungamento e il rimodellamento dei filamenti di actina.

La Cofilin1 attivata regola le dinamiche di actina, sia per la depolimerizzazione dei filamenti di actina alle loro estremità appuntite sia con la creazione di nuovi filamenti per il montaggio di F-actina tramite la loro attività [72, 73]. Quando la cofilina-1 è fosforilata da una LIMK1 / 2 o TESK, non può più legarsi a una F-actina o G-actina [74]. Inoltre, la cofilin-1 è necessaria per il mantenimento delle normali dinamiche dell'actina nelle cellule renali come podociti e cellule epiteliali tubulari [75, 76]. Presi insieme, questi risultati supportano l'idea che la cofilin-1 potrebbe regolare la formazione di fibra stress e anche mediare la traslocazione nucleare di NF- κ B. È stato osservato che la soppressione di cofilin-1 porta all'eccessivo aumento della formazione di fibre stress, ostacola la traslocazione di NF- κ B e diminuisce l'espressione delle sue proteine bersaglio, MCP1 e IL1 β nelle cellule HK2 [77].

Il carcinoma esofageo a cellule squamose (ESCC) ha attirato molta attenzione negli ultimi anni e la ricerca si è concentrata su questa patologia poiché il numero di casi registrati è aumentato gradualmente ESCC negli ultimi anni [78]. La ricerca e l'identificazione di biomarcatori specifici per ESCC è un approccio efficace per la diagnosi precoce di questi tumori. Lo studio ha cercato di approfondire l'espressione proteica della cofilina-1 e transgelin in 68 pazienti con il carcinoma dell'esofago a cellule squamose (ESCC) confrontata con 48 soggetti con normali tessuti dell'esofago. La correlazione tra cofilina-1 e la proteina transgelin espresse in ESCC è stata analizzata. I tassi di espressione sono risultati positivi per la cofilina-1 con il 60,3% (41/68) e per la transgelin con il 54,4% (37/68) per il tessuto affetto dal carcinoma esofageo [78]. I tassi positivi di espressione di cofilina-1 e transgelin in normale tessuto esofageo erano 27,1% (13/48) e il 29,1% (14/48), rispettivamente. Le differenze erano

statisticamente significativa ($p < 0.05$) [79]. Il tasso espressione positiva di cofilina-1 non ha mostrato differenze significative ($P > 0.05$) rispetto a fattori quali sesso, età, etnia, le dimensioni del tumore, o la profondità di infiltrazione; ma abbiamo avuto un aumento statisticamente significativo ($p < 0,05$) per quanto riguarda il parametro di differenziazione con i diversi gradi di tumore, metastasi linfonodali, e stadi clinici [80]. Il tasso di espressione positivo della proteina Transgelin non mostrava significative differenze per quanto riguarda ($P > 0.05$) il sesso, l'età, l'etnia, la dimensione del tumore, la profondità di infiltrazione, e stadio clinico, ma differiva significativamente ($p < 0,05$) sui fattori come il grado di differenziazione del tumore e metastasi linfonodali. Perciò la Cofilina-1 e la Transgelin possono svolgere ruoli nella carcinogenesi e soprattutto nello sviluppo di carcinoma esofageo a cellule squamose. Cofilina-1 può essere utile come biomarker importante per indicare il grado di malignità del carcinoma esofageo a cellule squamose, e l'individuazione della Transgelin è utile nella diagnosi precoce del ESCC [80].

I tassi di espressione della cofilina - 1 nel tessuto affetto dalla ESCC e tessuto normale erano di 60,3 % (41/68) e di 27,1 % (13/48) , rispettivamente; portando quindi i tassi di espressione tra tessuto tumorale e tessuto normale ad una differenza statisticamente significativa ($P < 0.05$).

Le differenze nell'indice di espressione della cofilina – 1 in pazienti con basso , moderata o elevata stadiazione del tumore erano statisticamente significative ($p < 0,05$) , ciò indica che la cofilina -1 gradualmente aumenta all'avanzare del grado di stadiazione del tumore [80].

La Cofilina - 1 è una delle principali proteine responsabili della motilità cellulare ed è regolata da molti fattori , come la legatura di fosfoinositidi e fosforilazione [81, 82]. La sovra-espressione della cofilina-1 può aumentare la velocità di migrazione delle cellule nel glioblastoma umano [83, 84]. La Cofilina - 1 è un fattore chiave nella regolazione del ciclo cellulare e svolge un ruolo cruciale nella patogenesi e sviluppo di neoplasie [85, 86]. La sovra- espressione della cofilina - 1 è stata riscontrata anche nelle cellule tumorali invasive nel cancro

della cervice ,nel cancro al fegato , cancro del colon , cancro gastrico , cancro al pancreas e in fine nel cancro del rene [87, 88]. La up- regulation dell' espressione della cofilina -1 è stato il fattore principale nel determinare la prognosi di adenocarcinoma polmonare [88].

CONCLUSIONI

I principali tumori delle ghiandole salivari, benigni e maligni, sono neoplasie rare della testa e del collo. Questo studio ha cercato, grazie alla'analisi proteomica, di identificare e validare biomarcatori specifici di queste neoplasie per avere una diagnosi pre-operatoria precisa ed affidabile. Nel complesso, i nostri risultati mettono in evidenza l'utilità e la potenzialità di un approccio proteomico per lo studio di questi, in particolare per il grado di discriminazione tra i due tipi di lesione, benigna e maligna della ghiandola parotidea. Una diagnosi precoce e precisa è fondamentale per avere un trattamento della malattia sicuro. Uno strumento diagnostico più affidabile aiuterebbe a distinguere neoplasie benigne parotidiche da quelle maligne, evitando inutili interventi chirurgici o permettendo una pianificazione con tempi e modi più adeguati per l'intervento chirurgico.

L'identificazione di queste proteine permette di contestualizzarle in un processo patologico e fornire così un'ulteriore prova dei meccanismi patogenetici di questi due istotipi di tumore benigno e maligno. Queste 4 proteine sono state identificate come differenzialmente espresse, 3 a favore del tumore maligno e 1 per l'adenoma pleomorfo. Sono stati quindi riscontrati biomarcatori specifici e sensibili per questi istotipi differenti. Con questi risultati si può delineare un profilo di biomarcatori in grado di aumentare esponenzialmente l'accuratezza della diagnosi pre-operatoria grazie alle analisi condotte sui campioni di ago aspirato. Serviranno ulteriori studi in proposito e sarà anche interessante studiare ed approfondire il ruolo che queste proteine hanno nello sviluppo ontogenetico. Gli istotipi esistenti sono numerosi e molto simili tra loro, come sono istologicamente molto simili tra loro tumori benigni come l'adenoma pleomorfo e tumori maligni come il carcinoma muco epidermoide. Con questo studio siamo riusciti ad ottenere dati attendibili su queste 4 proteine, scopo che ci eravamo prefissati. L'analisi proteomica potrebbe avere un grosso impatto nel ricavare una diagnosi pre-operatoria più accurata, dato che queste lesioni rappresentano l'80% dei tumori della testa e del collo.

L'evidenza di questo studio sta nel fatto che queste proteine hanno un'importanza statisticamente rilevante in queste lesioni. Con questa ricerca si aggiunge un altro tassello alla validità di questi biomarcatori con elevata sensibilità ed affidabilità.

BIBLIOGRAFIA

1. Pasqualino A, Panattoni GL. *Anatomia Umana, Citologia, Istologia, Embriologia, Anatomia sistemica*, capitolo 26 pag 536
2. Dionigi R. *Chirurgia* quinta edizione capitolo 114 Castelnuovo P, Latorre P. pag 1485
3. Rindi G, Manni E. *Fisiologia umana*, VIII edizione, volume secondo, sezione dodicesima SISTEMA DIGERENTE, capitolo 60 pag 117
4. Gesi M, Ferrucci M, Ghelarducci G. *Anatomia del corpo Umano; II Volume* seconda edizione; capitolo Apparato Digerente pag 92
5. Rindi G, Manni E. *Fisiologia umana*, VIII edizione, volume secondo, sezione dodicesima SISTEMA DIGERENTE, capitolo 60 pag 1178-1179-1180-1181
6. Spriano G. *I tumori delle ghiandole salivari maggiori* (2008)
7. Araya J, Martinez R, Niklander S, Marshall M, Esguep A. Avenida Valparaiso *Incidence and prevalence of salivary gland tumours in Valparaiso, Chile*. 1560, Viña del Mar, Chile 2015 Sep 1; 20: 532-9
8. Rice DH. Malignant salivary gland neoplasm. *Otolaryn Clin North America* 1999; 32: 875-86
9. Rinaldo A, Shaha AR, Pellitteri PK, Bradkey PJ, Ferlito A. Management of malignant sublingual salivary gland tumors. *Oral Onc* 2004; 40: 2-5
10. Eveson JW, Auclair P, Gnepp DR, El-Naggar AK. Tumors of the salivary glands: introduction. In: Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D, editors. *World Health Organization. Classification of Tumors, Pathology and Genetics of Head and Neck Tumors*. Lyon: IARC Press; 2005.p.212
11. Eisele DW, Jhons ME. Salivary gland neoplasms. In: Bailey BJ, Calhoun KH, editors. *Head and Neck Surgery-Otolaryngology*. Second Edition. Philadelphia, PA: Lippincott-Raven Publishers; 1998.p.1485
12. Muscate JE, Wynder EL. A case/control study of risk factors for major salivary gland cancer. *Otolaryngol Head and Neck Surg* 1998; 118: 195-8

13. Preston-Martin S, Thomas DC, White SC, Cohen D. Prior exposure to medical and dental X-rays related to tumors of the parotid gland. *J Natl Cancer Inst* 1988; 80: 943-9
14. Horn-Loss PL, Ljung BM, Morrow M. Environmental factor and the risk of salivary gland cancer. *Epidemiology* 1997; 8: 419-9
15. Berg JW, Hutter RUP, Foote FW, Jr. The unique association between salivary gland cancer and breast cancer. *JAMA* 1968; 204: 771-4
16. Prior P, Waterhous JAH. Second primary cancers in patients with tumors of the salivary glands. *Br J Cancer* 1977; 36: 362-8
17. Horn Ross PL, Morrow M, Ljung BM. Menstrual and reproductive factors for salivary gland cancer risk in women. *Epidemiology* 1999; 10: 528-30
18. Christiansen MS, Mourad WA, Hales ML, Oldring DJ. Spindle cell malignant lymphoepithelial lesion of the parotid gland: clinical light microscopic, ultrastructural, and in situ hybridization findings in one case. *Modern Pathology* 1995; 8: 711-5
19. Hardell L, Hallquisit A, Hannson Mild K, Carlberg M, Gertzén H, et al. No association between the use of cellular or cordless telephones and salivary gland tumors. *Occup Environ Med* 2004; 61: 675-9
20. Swanson GM, Burns PB. Cancer incidence among women in the workplace: a study of the association between occupation and industry and 11 cancer sites. *J Occup Environ Med* 1995; 37: 282-7
21. Williams RR, Horn JW. Association of cancer sites with tobacco and alcohol consumption and socioeconomic status of patients: interview study from the Third National Cancer Survey. *J Natl Cancer Inst* 1977; 58: 525-47
22. Spitz MR, Fueger JJ, Goepfert H, Newell GR. Salivary gland cancer. A case-control investigation of risk factors. *Arch Otolaryngol Head and Neck Surg* 1990; 116: 1163-6
23. Seymour I. Schwartz; Principi di Chirurgia; volume 1, 4^a edizione (1984); capitolo 16 *Tumori della testa e del collo*; pag 584-585-586

24. Castelnovo P, Latorre P, Dionigi R. *Chirurgia*, quinta edizione, sezione X, capitolo 114 pag 1488-1490
25. Alan Stevens, James Lowe; *Patologia*, seconda edizione, capitolo 12 *PATOLOGIA ORALE E OTORINOLARINGOIATRICA*, pag228
26. Shenoy VS¹, Kamath MP, Sreedharan S, Suhas SS. *Adenoid cystic carcinoma of the parotid gland associated with salivary calculi: An unusual presentation*. 2015 ; 11: 652
27. Bellantone R, De Toma G, Montorsi M. *Chirurgia Generale*, edizione minerva medica, “metodologia” “ghiandole salivari” capitolo 6 pag 32-33-34
28. Bellantone R., De Toma G, Montorsi M. *Chirurgia Generale*, edizione minerva medica, “Patologia Sistemica” “Collo: Patologia delle ghiandole salivari” C.P. Lombardi, M. Raffaelli, C. De Crea)capitolo 31 pag 296-297-298
29. Licitra L., Cesare Grandi C., Molinari R.; Major and minor salivary gland tumors. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 2003; 43: 215-225
30. Zhan KY, Lentsch EJ. *Basal cell adenocarcinoma of the major salivary glands: A population-level study of 509 cases*. Department of Otolaryngology-Head and Neck Surgery, Medical University of South Carolina, Charleston, South Carolina, U.S.A.
31. Anderson NL, Anderson LG. *Proteome and proteomics: new technologies, new concept and new words*. *Electrophoresis* 1998; 19: 1853-61
32. Dayhoff, M.O. *Atlas of protein sequence and structure*, Washington: National Biomedical Research Foundation, 1965-1978.
33. Gonzalez-Buitrago JM, Ferreira L, Muniz MC *Proteomica clinica y nuevos biomarcadores en los liquidos biologicos*. *Med Clin Barc*, 2008; 131: 426-34
34. Fields S. *Science*. 2001 Feb 16;291(5507):1221-4. *Proteomics. Proteomics in genomeland*. Howard Hughes Medical Institute, Departments of Genetics and Medicine, University of Washington, Seattle, WA 98195, USA)
35. Biomarkers Definitions Working Group Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework *Clin Pharmacol Ther* 2001; 69: 89-95

36. Bjellqvist B, Righetti PG, Giannazza E, Gorg A, Westermeier R, Postel W. Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: principle, methodology, and some applications. *J. Biochem. Biophys. Methods*. 6, 317-339. 1982
37. Gorg A, Postel W, Weser J, Gunther S, Stahler JR, Hanash SM, Somerlot L. Elimination of point streaking on silver-stained two-dimensional gels by addition of iodoacetamide to the equilibration buffer. *Electrophoresis* 8, 122-124. 1987
38. Bonaccorsi di Patti MC, Contestabile R, Di Salvo ML. *METODOLOGIE BIOCHIMICHE*, capitolo 5 "Metodologie per la purificazione delle proteine: tecniche di analisi" pag 133-134
39. Gygi, SP. *Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags*, in "Nature biotechnology", 1999, XVII, pp. 994-999
40. Ingram VM. *Abnormal human haemoglobins. 1. The comparison of normal human and sickle-cell haemoglobins by "fingerprinting"*, in "Biochimica et biophysica acta", 1958, XXVIII, pp. 539-545
41. Mann M, Hendrickson RC, Pandey A. *Analysis of proteins and proteomes by mass spectrometry*, in "Annual review of biochemistry", 2001, LXX, pp. 437-473.
42. Solito E, de Coupade C, Parente L, Floewr RJ, Russo-Marie F. Human annexin 1 is highly expressed during the differentiation of the epithelial cell line A 549: involvement of nuclear factor interleukin 6 in phorbol ester induction of annexin 1. *Cell Growth Differ* 1998; 9: 327-36
43. Morgan RO, Fernandez MP. Annexin gene structures and molecular evolutionary genetics. *Cell Mol Life Sci* 1997; 53: 598-615
44. Morgan RO, Jenkins NA, Gilbert DJ, Copeland G, Balsara BR, Testa JR, Fernandez MP. Novel human and mouse annexin A10 are linked to the genome duplications during early chordate evolution. *Genomics* 1999; 60: 40-49
45. Bastian BC. Annexin in cancer and autoimmune disease. *Cell Mol Life Sci* 1997; 53: 554-556
46. Hirata F. The regulation of lipomodulin, a phospholipase inhibitory protein, in rabbit neutrophils by phosphorylation. *J Biol Chem* 1981; 256: 7730-3

- 47.** Goulding NJ, Podgorski MR, Hall ND, Flower RJ, Browning JL, Pepinsky RB, Maddison PH. Autoantibodies to recombinant lipocortin-1 in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Ann Rheu Dis* 1989; 48: 843-50
- 48.** Stevens TR, Smith FS, Rampton DS. Antibodies to human recombinant lipocortin-1 in inflammatory bowel disease. *Cli Sci*. 1983; 84: 381-6
- 49.** Tsao FH, Meyer KC, Chen X, Rosenthal NS, Hu J. Degradation of annexin in bronchoalveolar lavage fluid from patients with cystic fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1998; 18: 120-8
- 50.** Probst-Cousin S, Kowollik D, Kuchelmeister K, Kayser C, Neudorfer B, Heuss D. Expression of annexin-1 in multiple sclerosis plaques. *Neurophatol Appl Neurobiol* 2002; 28: 802-10
- 51.** Knott C, Stern G, Wilkin GP. Inflammatory regulators in Parkinson's disease: iNOS, lipocortin-1 and cyclooxygenases-1 and -2. *Mol Cell Neurosci* 2000; 16: 724-39
- 52.** John CD, Christian HC, Morris JF, Flower RJ, Solito E, Buckingham JC. Annexin 1 and the regulation of endocrine function. *Trends Endocrinol Metab*. 2004; 15: 103-109
- 53.** Flower RJ, Rothwell NJ. Lipocortin-1: cellular mechanisms and clinical relevance. *Trend Pharmacol Sci* 1994; 15: 7-76
- 54.** Kim SW, Rhee HJ, Ko, Kim HG, Yang JM. Inhibition of cytosolic phospholipase A₂ by annexin-1. Specific interaction model and mapping of the interaction site. *J Biol Chem*. 2001; 276: 5712-19
- 55.** Davidson FF, Dennis EA, Powell M, Glenney JR. Inhibition of phospholipase A₂ by "lipocortins" and calpactins. An effect of binding to substrate phospholipid. *J Biol Chem* 1987; 262: 1698-705
- 56.** Wu CC, Croxtall JD, Perretti M, Bryant CE, Thiemermann C, Flower RJ. Lipocortin 1 mediates the inhibition by dexamethasone of the induction by endotoxin of nitric oxide synthase in the rat. *Proc Natl Acad Sci* 1995 USA 92: 3473-77

- 57.** Petrella A, Festa M, Ercolino SF, Stassi G, Solito E, Parente L. Induction of annexin-1 during TRAIL-induced apoptosis in thyroid carcinoma cells. *Cell Death Differ* 2005; 12: 1358-60
- 58.** Nomura H, Uzawa K, Yamano Y, Fushimi K, Nakashima D, Kouzu Y, Kasamatsu A, Ogawara K, Shiiba M, Bukawa H, Yokoe H, Tanzawa H. Down-regulation of plasma membranous Annexin A1 protein expression in premalignant and malignant lesions of the oral cavity: correlation with epithelial differentiation. *J Cancer Res Clin Oncol* 2009; 135: 943-9
- 59.** Young-joon L, Sang-ho J, Soon-chan H, Bok-im C, Woo-song H, Soon-tae P, Sang-kyung C, Eun-jung J, Young-tae J, Chi-young J, Jae Won K, Chang Won L, Jiyun Y, and Gyung Hyuck K. Prognostic value of CAPZA1 overexpression in gastric cancer . *Int J Oncol.* 2013; 42: 1569–1577
- 60.** Mueller HW, Michel A, Heckel D. Identification of an amplified gene cluster in glioma including two novel amplified genes isolated by exon trapping. *Hum Genet.* 1997;101:190–197
- 61.** Kellner R, Lichtenfels R, Atkins D. Targeting of tumor associated antigens in renal cell carcinoma using proteome-based analysis and their clinical significance. *Proteomics.* 2002; 2: 1743–1751
- 62.** Caldwell JE, Heiss SG, Mermall V, Cooper JA. Effects of CapZ, an actin capping protein of muscle, on the polymerization of actin. *Biochemistry.* 1989; 28: 8506–8514
- 63.** Liao H, Li Y, Brautigan DL, Gundersen GG. Protein phosphatase 1 is targeted to microtubules by the microtubule-associated protein Tau. *J Biol Chem.* 1998; 273: 21901–21908
- 64.** Daxin S, Mian Z, Kowolik M, Vijay T, Xiyong L, Qin H, Kemp H, Kernstine, Fangru L, and Binghui S. Differential expression patterns of capping protein, protein phosphatase 1 and casein kinase 1 may serve as diagnostic markers for malignant melanoma. *Melanoma Res.* 2011; 21: 335–343

65. Teumer A., Rawal R., Homuth G., et al. Genome-wide association study identifies four genetic loci associated with thyroid volume and goiter risk. *American Journal of Human Genetics*. 2011;88:664–673
66. Mejillano M. R., Kojima S.-I., Applewhite D. A., Gertler F. B., Svitkina T. M., Borisy G. G. Lamellipodial versus filopodial mode of the actin nanomachinery: pivotal role of the filament barbed end. *Cell*. 2004; 118: 363–373
67. Sinnar S. A., Antoku S., Saffin J.-M., Cooper J. A., Halpain S. Capping protein is essential for cell migration in vivo and for filopodial morphology and dynamics. *Molecular Biology of the Cell*. 2014; 25: 2152–2160
68. Huang TL, Sung ML, Chen TY. 2D-DIGE proteome analysis on the platelet proteins of patients with major depression. *Proteome Sci*. 2014; 12: 1
69. Mizuno K. Signaling mechanisms and functional roles of cofilin phosphorylation and dephosphorylation. *Cell Signal*. 2013;25:457–469
70. Fazal F, Bijli KM, Minhajuddin M, Rein T, Finkelstein JN, Rahman A. Essential role of cofilin-1 in regulating thrombin induced RelA/p65 nuclear translocation and intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) expression in endothelial cells. *J Biol Chem*. 2009;284:21047–21056
71. Fazal F, Minhajuddin M, Bijli KM, McGrath JL, Rahman A. Evidence for actin cytoskeleton-dependent and -independent pathways for RelA/p65 nuclear translocation in endothelial cells. *Biol Chem*. 2007; 282: 3940–3950
72. Hotulainen P, Paunola E, Vartiainen MK, Lappalainen P. Actin-depolymerizing factor and cofilin-1 play overlapping roles in promoting rapid F-actin depolymerization in mammalian nonmuscle cells. *Mol Biol Cell*. 2005; 16: 649–664
73. Ichetovkin I, Grant W, Condeelis J. Cofilin produces newly polymerized actin filaments that are preferred for dendritic nucleation by the Arp2/3 complex. *Curr Biol*. 2002; 12: 79–84

- 74.** Scott RW, Olson MF. LIM kinases: function, regulation and association with human disease. *J Mol Med.* 2007; 85: 555–568
- 75.** Ashworth S, Teng B, Kaufeld J, Miller E, Tossidou I, Englert C. Cofilin-1 Inactivation Leads to proteinuria-Studies in Zebrafish. Mice and Humans. *PLoS One.* 2010; 5: 12626
- 76.** Ashworth SL, Sandoval RM, Hosford M, Bamburg JR, Molitoris BA. Ischemic injury induces ADF relocalization to the apical domain of rat proximal tubule cells. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2001; 280 :F886–F894
- 77.** Quan-zhen Wang, Hai-qing Gao, Ying Liang, Jun Zhang, Jian Wang, and Jie Qiu Cofilin1 is involved in hypertension-induced renal damage via the regulation of NF- κ B in renal tubular epithelial cells. *J Transl Med.* 2015; 13: 323
- 78.** Yan Zhang, Ruyi Liao, Hui Li, Ling Liu, Xiao Chen, and Hongming Chen Expression of Cofilin-1 and Transgelin in Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *Med Sci Monit.* 2015 Sep 7; 21: 2659-65.
- 79.** Lv XP, Pu HW, Gong XJ, et al. Proteomic analysis of differentially expressed proteins in esophageal squamous cell carcinoma by MALDI-TOF-MS. *World Chinese Journal of Digestology.* 2011; 19: 3682–86
- 80.** Zhang Y, Zhang YL, Chen HM, et al. Expression of Bmi-1 and PAI-1 in esophageal squamous cell carcinoma. *World J Gastroenterol.* 2014; 20 :5533–39
- 81.** Müller CB, De Bastiani MA, Becker M, et al. Potential crosstalk between Cofilin-1 and EGFR pathways in cisplatin resistance of non-small-cell lung cancer. *Oncotarget.* 2015; 28: 3531–39
- 82.** Grego-Bessa J, Hildebrand J, Anderson KV. Morphogenesis of the mouse neural plate depends on distinct roles of cofilin 1 in apical and basal epithelial domains. *Development.* 2015; 142: 1305–14
- 83.** Huang H, Li X, Hu G, et al. Poly(ADP-ribose) glycohydrolase silencing down-regulates TCTP and Cofilin-1 associated with metastasis in benzo(a)pyrene carcinogenesis. *Am J Cancer Res.* 2014; 5: 155–67

- 84.** Tsai CH, Lin LT, Wang CY, et al. Over-expression of Cofilin-1 suppressed growth and invasion of cancer cells is associated with up-regulation of let-7 microRNA. *Biochim Biophys Acta*. 2015; 1852: 851–61
- 85.** Liu G, Xiang Y, Guo C, et al. Cofilin-1 is involved in regulation of actin reorganization during influenza A virus assembly and budding. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014; 453: 821–25
- 86.** Barone E, Mosser S, Fraering PC. Inactivation of brain Cofilin-1 by age, Alzheimer's disease and γ -secretase. *Biochim Biophys Acta*. 2014; 1842: 2500–9
- 87.** Li R, Wang X, Zhang XH, et al. Ursolic acid promotes apoptosis of SGC-7901 gastric cancer cells through ROCK/PTEN mediated mitochondrial translocation of Cofilin-1. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2014; 15: 9593–97
- 88.** Wang Y, Kuramitsu Y, Kitagawa T, et al. Cofilin-phosphatase slingshot-1L (SSH1L) is over-expressed in pancreatic cancer (PC) and contributes to tumor cell migration. *Cancer Lett*. 2015; 360: 171–76